

JOVANA KAROLINE DE LIMA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE BUTIRILCOLINESTERASE E  
SÍNDROME METABÓLICA**

CURITIBA

2013

JOVANA KAROLINE DE LIMA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE BUTIRILCOLINESTERASE E  
SÍNDROME METABÓLICA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lupe Furtado-Alle

CURITIBA

2013

“Se soubermos que um obstáculo é intransponível, deixa de ser um obstáculo para se tornar um ponto de partida”.  
(József Eotvos)

## RESUMO

A Síndrome Metabólica (SM) consiste da combinação de distúrbios metabólicos que predisõem ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes do tipo 2. A butirilcolinesterase (BChE), uma esterase sérica codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1) já foi associada a fatores considerados de risco para o desenvolvimento de SM, como obesidade, níveis de colesterol e diabetes. Foram genotipados os SNPs - 116 (G/A rs1126680) e 1914 (A/G rs3495) do gene *BCHE*, mensurada a atividade enzimática, utilizando propioniltiocolina como substrato a 25 °C; analisadas as isoformas da BChE (G1, G1-alb, G2 e G4) e fenotipado o produto do loco *CHE2*, para relacionar com variáveis antropométricas e bioquímicas em amostra populacional de 290 indivíduos de Curitiba/PR Brasil. O alelo 1914G foi encontrado com maior frequência no grupo de obesos que em não obesos, sendo associado, portanto, a um maior IMC. Esteve também associado a menor atividade enzimática em relação aos homozigotos 1914AA. Esta menor atividade pode causar um desbalanço no metabolismo de lipídeos, podendo assim aumentar a predisposição à obesidade e diminuir a habilidade da BChE em auxiliar na manutenção da homeostase. Diferenças observadas entre os gêneros foram expressivas: homens apresentaram atividades superiores às mulheres quanto à atividade total (AT) e atividade relativa (AR) de G1, G1-alb e G2. Portadores do fenótipo CHE2 C5+ apresentaram AT e AR de todas as formas moleculares analisadas superiores que em indivíduos CHE2 C5-. Foram observadas correlações positivas da atividade total da BChE com IMC, colesterol total, LDL, triglicerídeos e glicemia, e correlação negativa com HDL. Obesos apresentaram maior AT e atividade relativa de G4, indicando que a enzima tem relação com variáveis presentes na SM. Dessa forma pode-se considerar a atividade da BChE um marcador secundário de riscos associados à SM, ressaltando que devem ser consideradas diferenças devido ao gênero e ao fenótipo do loco *CHE2*.

Palavras-chave: Butirilcolinesterase, Obesidade, Atividade da BChE, Índice de Massa Corporal, Metabolismo de Lipídeos.

## ABSTRACT

Metabolic syndrome (MS) is a combination of metabolic disorders that predispose to cardiovascular disease and type 2 diabetes. The butyrylcholinesterase (BChE), a serum esterase encoded by the gene *BCHE* (3q26.1), had been associated to risk factors for developing MS, as obesity, diabetes and cholesterol levels. Two SNPs of *BCHE* gene were genotyped: SNPs -116 (G/A rs1126680) and 1914 (A/G rs3495). The enzyme activity was measured using propioniticolina as substrate; the isoforms of BChE (G1, G1-alb, G2 and G4) were analyzed, and loco *CHE2* product was phenotyped. All these BChE variables were analyzed along with anthropometric and biochemical variables in a populational sample of 290 individuals from Curitiba/ PR Brazil. The 1914G allele was found with higher frequency in the obese group than in non-obese, and it was, therefore, associated with a higher BMI. It was also associated with lower enzyme activity compared to homozygous 1914AA. This lower activity may cause an imbalance in lipid metabolism and can thus increase the predisposition to obesity and decrease the ability of BChE to maintain homeostasis. Differences between genders were expressive: men showed higher activity than women in total activity (TA), relative activity (RA) of G1, G2 and G1-alb. CHE2 C5+ individuals presented TA and RA of all molecular forms analyzed higher than CHE2 C5-. Total activity of BChE was positively correlated with BMI, total cholesterol, LDL, triglycerides and glucose levels, and negatively with HDL. Obese subjects showed greater TA and RA of G4, indicating that the enzyme activity is related with variables present in the MS, and thus can be considered as a secondary marker of risks associated with MS, highlighting differences that must be considered due to gender and to phenotype of *CHE2* loco.

**Keywords:** Butyrylcholinesterase, Obesity, BChE activity, Body Mass Index, Lipid Metabolism

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>08</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>10</b>
2.1 A Síndrome metabólica.....	10
2.2 <i>BCHE</i> .....	13
2.2.1 Butirilcolinesterase (BChE) e função.....	13
2.2.2 Formas moleculares da BChE.....	14
2.2.3 Gene <i>BCHE</i> .....	16
2.2.4 Região regulatória do gene <i>BCHE</i> .....	17
2.2.5 Variantes do gene <i>BCHE</i> : -116A e 1914G.....	18
2.2.6 Loco <i>CHE2</i> .....	20
2.3 BChE e a Síndrome Metabólica.....	20
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>22</b>
3.1 Objetivo Geral.....	22
3.2 Objetivos Específicos.....	22
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>23</b>
4.1 <b>ARTIGO 1:</b> 1914G Variant of BCHE gene associated with enzyme activity, obesity and triglycerides levels.....	23
4.2 <b>ARTIGO 2:</b> Butyrylcholinesterase and variables related to obesity in a population sample from southern brazil.....	31
<b>5 DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>41</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>43</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>44</b>
<b>8 APÊNDICES.....</b>	<b>50</b>
8.1 Resumo para o 58º Congresso Brasileiro de Genética: 1914G variant of the BCHE gene associated with enzyme activity and body mass index.....	50

8.2 Resumo para o XV Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica: Atividade relativa das formas moleculares da butirilcolinesterase e obesidade.....	51
<b>9 ANEXOS.....</b>	<b>52</b>
9.1 Descrição da metodologia utilizada.....	52
9.1.1 Amostras.....	52
9.1.2 Extração do DNA.....	52
9.1.3 Genotipagem das variantes alélicas – <i>Taqman</i> .....	53
9.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção das bandas G1, G1-alb, G2 e G4.....	54
9.1.5 Medida da atividade da BChE.....	56
9.1.6 Eletroforese em gel de ágar para fenotipagem do loco <i>CHE2</i> .....	57

## 1 INTRODUÇÃO

A Síndrome Metabólica (SM) consiste da combinação de distúrbios metabólicos, tais como resistência à insulina, hiperlipidemia, hipertensão, obesidade, excesso de gordura visceral e baixos níveis de HDL-colesterol. Sabe-se que tais características são fatores de risco também para diabetes do tipo 2 e doenças cardiovasculares (DCV) (ALCÂNTARA *et al.*, 2005).

Não existe um único critério aceito universalmente para definir a Síndrome. Os mais aceitos são os da Organização Mundial de Saúde (OMS) e os do National Cholesterol Education Program (NCEP – ATP III). O Brasil também dispõe do seu Consenso Brasileiro sobre Síndrome Metabólica, documento referendado por diversas entidades médicas (OLIVEIRA, 2013). Como os componentes individuais também são fatores de risco independentes para o desenvolvimento de DCVs, as tentativas de se estabelecer critérios diagnósticos para esta síndrome são baseadas no princípio de que estes componentes podem agir de maneira sinérgica ou aditiva amplificando esse risco (ATHANASSIOU, 2008). Tal imprecisão quanto à sua definição se justifica pelo fato de que estudos sobre mecanismos fisiopatológicos e riscos cardiovasculares, bem como as tentativas de definição, serem recentes e ainda restarem muitas dúvidas e indefinições sobre o assunto. A definição mais utilizada é a do NCEP -ATP III, pois seus critérios são os de mais fácil aplicação clínica (KASSI *et al.*, 2011).

A prevalência de doenças crônicas não-transmissíveis está aumentando em proporções preocupantes. Cerca de 18 milhões de pessoas morrem por ano em decorrência de DCV, cujos maiores fatores de predisposição são diabetes e hipertensão, que por sua vez estão fortemente relacionados ao excesso de peso e obesidade. Nos últimos 20 anos, as taxas de obesidade triplicaram nos países em desenvolvimento, e hoje, mais de 1,1 bilhão de adultos no mundo estão com sobrepeso, dos quais 312 milhões são obesos (HOSSAIN, KAWAR e NAHAS, 2007). Diante da preocupação com a alta prevalência mundial da obesidade (e suas consequências), o estudo da SM tornou-se um tópico de discussão científica, sendo considerado também um dos grandes desafios da medicina contemporânea.

A butirilcolinesterase humana (BChE) é uma colinesterase não específica que hidrolisa diferentes ésteres de colina. A BChE é sintetizada pelas células hepáticas e



então difundida para outras partes do corpo (WESCOE *et al.*, 1947). Chatonnet e Lockridge (1989) afirmam que a BChE é também sintetizada no cérebro e Oreskovic e Kunec-Vaji (1992) demonstraram que em murinos, ela também é sintetizada nas células do tecido adiposo. A enzima é codificada pelo gene *BCHE* (3q26.1), que apresenta quatro éxons (ARPAGAUS *et al.*, 1990) com mais de 70 variantes já descritas, sendo a maioria rara (JACKOWSKI, 2009).

Vários fatores metabólicos foram associados com alterações na atividade da BChE, como por exemplo, a síntese de estrógenos durante a gravidez (correlacionados negativamente com a atividade da BChE) (SHNIDER, 1965), peso (Souza *et al.*, 2005), índice de massa corporal (ALCÂNTARA *et al.*, 2005), obesidade (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008) e diabetes do tipo 2 (SRIDHAR *et al.*, 2005) (correlacionados positivamente com a atividade da BChE).

A correlação de anormalidades lipídicas com obesidade, diabetes, e SM pode implicar no envolvimento da BChE. Randell *et al.* (2005) verificaram que a atividade da BChE plasmática foi significativamente maior em pacientes com fatores de risco de SM, que indivíduos controle no Canadá. Entretanto, o significado funcional da alta atividade da BChE ainda não é conhecido. Benyamin *et al.* (2011) investigaram as causas genéticas da variação na atividade da BChE e também as causas das covariações com marcadores de risco de SM. Os autores demonstraram que a atividade da BChE está relacionada significativamente com IMC (índice de massa corporal), HDL e LDL-colesterol, triglicerídeos, glicose, insulina, proteína C-reativa, sugerindo que essa relação é decorrente de causas multifatoriais (tendo também efeitos, por exemplo, dos produtos dos genes *RAPH1-ABI2*, *RNPEP*, *UGT1A1* e influenciado por fatores ambientais).

Diante dos múltiplos aspectos que estão envolvidos no desenvolvimento de SM, vem se percebendo o papel fundamental da genética, esse estudo visa investigar a associação entre as mutações -116A e 1914G do gene *BCHE*, atividade total da BChE e atividade relativa das formas moleculares, bem como fenotipagem do loco *CHE2*, com variáveis antropométricas e bioquímicas relacionadas a risco de SM.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 SÍNDROME METABÓLICA

Desde aproximadamente a segunda metade do século XX ocorreram profundas mudanças nos padrões socioeconômicos e culturais que acarretaram grandes transformações no estilo de vida das pessoas no mundo como um todo. Essas transformações foram significativas no sentido de exercer influência no aumento e melhoria da expectativa de vida das pessoas, mas também influenciaram em alguns aspectos na qualidade de vida de forma negativa, através de alterações, por exemplo, nos hábitos alimentares e no gasto energético relacionado às atividades diárias, bem como o estresse, em grande parte causado pela vida urbana e moderna. Tais fatores têm contribuído para o aumento da incidência de várias doenças crônicas, como a obesidade, o diabetes e a hipertensão arterial, que frequentemente estão relacionados a alterações nos níveis de lipoproteínas plasmáticas e risco aumentado de doenças cardiovasculares (BURKE e BELL, 2000).

A Síndrome Metabólica (SM) é um termo estabelecido no final da década de 1990 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), que reúne fatores de risco para doenças cardiovasculares (DCV), entre eles a hipertensão, intolerância à glicose/diabetes do tipo 2, altos níveis de triglicerídeos e dislipidemia (LDL-colesterol alto, triglicérides alto e HDL-colesterol baixo) (WHO, 1999). Outras anormalidades metabólicas também tem sido associadas à síndrome, tais como: obesidade (principalmente abdominal), estados pró-inflamatórios e pró-trombóticos.

A falta de consenso sobre os critérios aceitos para definir a síndrome, dificulta vários estudos sobre prevalência da SM. Em 2001, o “Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults” (NCEP-ATPIII) definiu critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico de SM (GRUNDY *et al.*, 2004), que foi mais viável de se estudar clínica e cientificamente. Segundo o NCEP-ATPIII, a SM representa a combinação de pelo menos três componentes apresentados na tabela 1.

A “epidemia da obesidade” é apontada como o principal responsável pelo aumento na prevalência de SM, dessa forma, esta seria uma potencial candidata à etiologia principal da síndrome em questão. Grundy *et al.* (2004) definem a síndrome metabólica essencialmente como um agrupamento de complicações metabólicas decorrentes da obesidade. A obesidade, especialmente com acúmulo de gordura abdominal, pode produzir hormônios e outras substâncias que causam sérios problemas tais como, resistência à insulina, hipertensão, dislipidemias. Sabe-se que adipócitos possuem importante função, envolvendo vias inflamatórias, trombóticas, sensibilidade à insulina, além da habilidade para produzir e secretar hormônios específicos que regulam a homeostase energética (STEPHENS, 2012). Outra consequência do excesso de gordura abdominal é a presença de níveis elevados de ácidos graxos não esterificados, que podem sobrecarregar o fígado e os músculos, e predispor a resistência à insulina. Há evidências de que também elevem níveis de PAI-1 (inibidor do ativador do plasminogênio tipo 1), o qual contribui diretamente nas complicações da obesidade, podendo inclusive, influenciar no acúmulo de gordura visceral (BARBATO *et al.*, 2009).

**Tabela 1 – Identificação clínica da síndrome metabólica**

Componentes	Níveis
<b>Obesidade abdominal (circunferência)</b>	
Homens	> 102 cm
Mulheres	> 88 cm
<b>Triglicerídeos</b>	≥ 150 mg/dL
<b>HDL Colesterol</b>	
Homens	< 40 mg/dL
Mulheres	< 50 mg/dL
<b>Pressão arterial</b>	≥ 130/85 mmHg
<b>Glicemia de jejum</b>	≥ 110 mg/dL

Fonte: NCEP-ATPIII (GRUNDY *et al.*, 2002).

A resistência à insulina também possui um papel central na etiologia de SM, por esta razão, entre outros nomes que a síndrome já teve, um deles foi “síndrome da resistência à insulina”. A síndrome metabólica já foi questionada cientificamente quanto a fato de consistir mesmo uma doença ou não. Entretanto, após diversos

estudos apontarem que múltiplos fatores de risco co-ocorrem em maior grau do que seria esperado ao acaso (MEIGS, 2002), é consenso considerar a coexistência de três ou mais dos sintomas listados, como característicos da síndrome em questão. Restam ainda na literatura, debates sobre os fatores que estão incluídos na SM, bem como os níveis dos parâmetros incluídos que são toleráveis (BRANDÃO, *et al.*, 2005).

As observações de que a síndrome metabólica apresenta prevalência elevada e crescente com o incremento da faixa etária são aspectos preocupantes, considerando o envelhecimento marcante da população em diferentes países (MEIGS, 2002). Ford (2003) estudando a prevalência de SM nos Estados Unidos, de acordo com os critérios da definição da NCEP-ATPIII, em amostra com idade superior ou igual a 20 anos, obteve a prevalência de 23,9%, e destacou em seu trabalho que a prevalência varia de acordo com a definição utilizada e com a população estudada, bem como seu grupo étnico. Ervin (2009) posteriormente, também nos Estados Unidos, e sob os mesmos critérios, estimou uma prevalência de 34% de SM em amostra populacional. Salaroli *et al.* (2007), utilizando também os mesmos critérios diagnósticos, obtiveram prevalência de 29,8% para a população de Vitória/ ES, Brasil. Nesse estudo foi constatado um aumento progressivo na prevalência de acordo com a idade (25 a 34 anos – 15,8%, enquanto que entre 55 e 64 anos a prevalência foi de 48,3%). Estudos anteriores (DALLONGEVILLE *et al.*, 2005) com o objetivo de verificar a relação entre renda familiar e SM, evidenciaram que a renda familiar está em geral associada inversamente com a SM em mulheres, mas não em homens, concordando com o estudo de Salaroli *et al.* (2007). Determinantes sociais são fortemente correlacionados com a SM, porém os motivos desta relação não estão totalmente elucidados.

Existem outros estudos sobre prevalência de SM no Brasil, mas os critérios diagnósticos variam, e geralmente a amostra é estratificada, não representando a população.

## 2.2 BCHE

### 2.2.1 Butirilcolinesterase (BChE) e função

As colinesterases (ChEs) são enzimas que desempenham papel chave na neurotransmissão colinérgica. Existem dois tipos de colinesterases nos vertebrados: acetilcolinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) e butirilcolinesterase (BChE, EC 3.1.1.8). A acetilcolinesterase é responsável por catalisar a hidrólise do neurotransmissor acetilcolina na membrana pós-sináptica na junção neuromuscular, originando acetato e colina. É encontrada também em eritrócitos e no sistema nervoso. A BChE é produzida no fígado, e distribuída amplamente no organismo, sendo um dos componentes do plasma, fígado, coração, pâncreas, endotélio vascular, pele, cérebro, músculo liso e adipócitos (CHATONNET e LOCKDRIDGE, 1989). Embora as duas enzimas apresentem formas moleculares com certa semelhança estrutural, incluindo monômeros, dímeros, tetrâmeros e oligômeros complexos, elas diferem em especificidade e sensibilidade inibitória (LOCKRIDGE *et al.*, 1987).

Embora permaneçam desconhecidos a função fisiológica e o substrato natural da BChE, sabe-se que ela é capaz de hidrolizar diversos ésteres de colina, desde a acetilcolina até heptanoilcolina, sendo mais eficiente na hidrólise de butirilcolina.

Anteriormente chamada de pseudocolinesterase, colinesterase do soro e colinesterase não específica, a BChE foi estudada e associada a diversos processos biológicos. Um deles, de grande importância é o seu papel em mecanismos farmacológicos e toxicológicos. Alguns compostos que podem ser desintoxicados fisiologicamente pela BChE são: succinilcolina; organofosfatos e carbamatos; cocaína; amitriptilina; drogas anticonvulsivas e aspirina (ÇOKUĞRAŞ, 2003).

Além das funções colinérgicas, a BChE possui papel no desenvolvimento animal, influenciando a morfogênese, movimentos morfogenéticos e também induzindo a expressão da AChE, que por sua vez estimula a diferenciação e adesão celular durante a neurogênese (ROBITZKI *et al.*, 1997).

Em humanos, a sequência de aminoácidos da BChE e da AChE tem 53% de identidade, sendo bem conservada no sítio ativo (LOCKRIDGE *et al.*, 1987). A análise filogenética da expressão da BChE e da AChE indica que a AChE é

ancestral das colinesterases em vertebrados, estas observações sugerem que um evento de duplicação gênica e subsequente divergência estrutural e funcional se procederam para o surgimento da BChE (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989).

Diversos estudos têm associado a BChE com aspectos metabólicos, por exemplo, com níveis de lipídeos (BENYAMIN *et al.*, 2011), peso (SOUZA *et al.*, 2005), índice de massa corporal (IMC) (ALCÂNTARA *et al.*, 2005) e obesidade (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991; KUTTY, 1980; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). A relação entre BChE e SM será abordada mais detalhadamente no item 2.3.

### **2.2.2 Formas moleculares e estrutura bioquímica da BChE**

No plasma, a BChE ocorre predominantemente como um tetrâmero (G4), formado por dímero de dímeros. Na formação de cada dímero, os monômeros estão ligados por pontes de dissulfeto e, ao formar o tetrâmero, os dímeros ligam-se entre si por ligações não covalentes. Outras formas moleculares, como monômeros (G1) e dímeros (G2), também estão presentes no plasma em menores proporções. Os monômeros são constituídos de 574 aminoácidos e nove cadeias de carboidratos, com peso molecular aproximado de 85 kDa (LOCKRIDGE *et al.*, 1987).

Existe uma nomenclatura anterior relativa às formas moleculares de BChE, baseada na mobilidade eletroforética, proposta por Harris, Hopkinson e Robson (1962) que encontraram quatro bandas em eletroforese de gel de amido, presentes normalmente em estudos de atividade da BChE humana, chamadas de C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub> em ordem crescente de mobilidade. A forma C<sub>1</sub> (G1) é um monômero; C<sub>2</sub> (referida como G1-alb) consiste de uma forma heteróloga da BChE, formada pela associação de um monômero ligado à albumina (MASSON, 1989); C<sub>3</sub> (G2) é um dímero; e C<sub>4</sub> (G4), que é a forma mais abundante da BChE plasmática, é o tetrâmero. Nesse mesmo trabalho, os autores verificaram uma quinta banda, presente somente em alguns indivíduos, à qual denominou C<sub>5</sub>, que consiste do tetrâmero ligado a uma substância ainda desconhecida de aproximadamente 60 kDa.

Nachon *et al.* (2002) descreveram a estrutura cristal da BChE a partir de uma BChE humana recombinante, uma vez que o homotetrâmero é altamente glicosilado e os grupamentos de açúcar, de modo geral, perturbam a cristalização. Apesar disso, os autores ressaltaram a importância desses domínios glicosilados,

que possuem papel essencial na conformação final da proteína, e também em processos de secreção, estabilidade e solubilidade, além de proteção contra a proteólise, contribuindo para um tempo maior na circulação sanguínea. Entretanto, na BChE, os resíduos aromáticos na entrada do sítio alvo, bem como outros domínios apresentam diferenças marcantes que tornam possível a ligação de uma gama maior de substratos na BChE em relação à AChE.

O sítio ativo da BChE humana é composto por aproximadamente 55 aminoácidos. O sítio aniônico periférico, localizado na região da entrada do sítio ativo, é formado pelos aminoácidos ácido aspártico (D70) e tirosina (Y332) os quais estão envolvidos no mecanismo de ativação de substratos carregados positivamente, assim como outros domínios, por exemplo o ácido aspártico conectado ao triptofano (W82), por meio de uma alça ômega ( $\Omega$ ), que consiste um sub-sítio de ligação do sítio ativo (MASSON *et al.*, 2001).

Alcântara *et al.* (1999) em análise da BChE do plasma sob eletroforese em gel de poliacrilamida, obtiveram 12 bandas, das quais oito representam formas heterólogas nas quais a BChE se liga a outras substâncias como a albumina, a  $\alpha$  2-macroglobulina, a transferrina e outras moléculas ainda não identificadas.

Boberg *et al.* (2010) ao verificar que indivíduos obesos possuem atividade da BChE significativamente maior que não-obesos, como já descrito anteriormente (Alcântara *et al.*, 2005), procuraram investigar se havia efeito das formas moleculares nesta atividade total. Os autores mensuraram então a intensidade relativa (IR) de cada banda eletroforética, referentes às formas moleculares de BChE, cujos resultados revelaram não haver diferença significativa, quanto à IR entre obesos e não-obesos. Levando assim a conclusão de que a alta atividade enzimática observada nos obesos, se deve a uma maior quantidade da BChE sob as formas moleculares em níveis proporcionais, constituindo, portanto, um mecanismo regulado especificamente, de modo a manter a IR independentemente do IMC. Silva *et al.* (2012) também investigaram a atividade da BChE e a RI, em adolescentes obesos antes e após 12 semanas de exercícios físicos. Os resultados permitiram concluir que a atividade dos obesos antes do programa foi maior, sendo que posteriormente ficou semelhante às de não-obesos. A IR das isoformas da BChE não apresentaram diferenças significativas antes e depois do programa, concordando com os resultados de Boberg *et al.* (2010).

### 2.2.3 Gene *BCHE*

Arpagaus *et al.* (1990) obtiveram evidências da existência de um único gene que codifica a BChE humana, bem como a estrutura deste gene.

Localizado na região 3q26.1, o gene *BCHE* possui quatro éxons (Figura 1). 1722 pares de bases, que codificam a enzima BChE madura, que é formada por 574 resíduos de aminoácidos (NCBI, acessado em 04/03/2013).



**Figura 1.** Desenho esquemático do gene *BCHE*, mostrando os quatro éxons representados como retângulos e o número de pares de bases que os compõem. A região sombreada corresponde à sequência que codifica a proteína madura. Fonte: Parnas *et al.*, 2011.

O éxon 1 (149 pb) contém sequências não traduzidas, e dois potenciais sítios de início de tradução nos códons -69 e -47. O éxon 2 (1.525 pb) contém 83% da sequência codificadora da proteína madura, incluindo a extremidade N-terminal. O primeiro códon que codifica para o peptídeo maduro está localizado no éxon 2. O éxon 3 contém 167 pb. O éxon 4 (604 pb) codifica a extremidade C-terminal da proteína e apresenta a região 3' não traduzida que possui dois sinais de poliadenilação (NCBI, acessado em 04/03/2013). A região que codifica a proteína madura abrange grande parte do éxon 2, todo o éxon 3 e parte do éxon 4, conforme mostrado na figura 1.

O mRNA da BChE humana possui 40% de C+G, que é, aproximadamente, a proporção dessas bases no genoma humano. Quando comparados com o índice de nucleotídeos C+G que codificam proteínas colinérgicas de mamíferos e aves (BChE, AChE, receptores nicotínicos e muscarínicos de acetilcolina e colina acetiltransferase) observa-se que o gene da BChE possui um conteúdo menor de C+G em relação a outras proteínas colinérgicas. O conteúdo de C+G pode ser importante para a regulação ao nível transcricional (CHATONNET e LOCKRIDGE, 1989). O mRNA da BChE é mais abundante na maioria dos tecidos que o da AChE, exceto no cérebro e músculo onde o mRNA da AChE é mais abundante (LEGAY *et al.*, 1993). No estudo de Jbilo *et al.* (1994) foram mensuradas as quantidades relativas de mRNA da BChE em tecidos humanos. Apresentaram maiores



proporções de mRNA, respectivamente, os seguintes órgãos: fígado> pulmão> cérebro> coração> músculo esquelético> pâncreas.

#### 2.2.4 Região regulatória do gene *BCHE*

Jbilo *et al.* (1994) caracterizaram a região promotora e sítios de início de transcrição da *BCHE* humana. Foi identificado a montante da região codificadora, o sítio de início de transcrição da *BCHE*, com 2500 pb. Eles não encontraram as sequências consensos CAAT e TATA boxes, entretanto identificaram uma região de homologia a sítios de início de transcrição encontrados em outros genes sem TATA box. Essa região é rica em pirimidinas e possui um sítio de ligação para AP1 (fator de transcrição), sítios para Oct-1 (proteína ligadora ao octâmero), PEA3 (elementos que contêm sequências similares ao sítio de ligação da classe ETS de oncoproteínas) e sítios de ligação de topoisomerase.

O sítio de ligação ao AP1 está localizado a 71 pb a montante do sítio de início da transcrição, incluído em um fragmento de 200 pb, que é definido como promotor mínimo do gene *BCHE* humano (JBILO *et al.*, 1994). Proteínas AP1 são frequentemente o alvo final de cascatas de quinases transdutoras de sinal, tornando-se ativas quando fosforiladas, ativando promotores e levando à expressão dos genes correspondentes (CAVIGELLI *et al.*, 1995).

Muitos genes de mamíferos que possuem sua expressão regulada durante o desenvolvimento, contêm sítios de ligação ao PEA3 nas suas regiões regulatórias. Os motivos PEA3 e AP1 podem funcionar sinergicamente para a ativação da transcrição (WASYLYK *et al.*, 1990).

O sítio de ligação ao Oct-1, identificado na região regulatória da *BCHE* humana, constitui um octâmero de nucleotídeos (ATTTGCAT), ao qual Oct-1 reconhece. Oct-1 é membro da família POU de fatores de transcrição (TF) (JBILO *et al.*, 1994). Na literatura, os membros da família POU de TF são conhecidos geralmente como fatores de transcrição necessários para expressão de genes de imunoglobulinas (Ig) nas células B, genes da histona H2B, reguladas de acordo com a fase do ciclo celular; e também para transcrição constitutiva de RNA nuclear pequeno (snRNA), que pode ser realizado pela RNA polimerase II ou III (KRAPP e STRUBIN, 1999). A capacidade da Oct-1 ativar diferencialmente a transcrição de

alguns genes é explicada pelo fato de ela interagir com proteínas de células específicas e com proteínas ubíquas específicas, que funcionam como fator de seletividade na expressão (HERR e CLEARY, 1995). Oct-1 é constituída de dois subdomínios estruturais, POU-S e POU-H, que se ligam diretamente ao DNA, ambos possuindo motivo estrutural hélice-volta-hélice, independentes entre si, e ligados por uma ponte altamente flexível. Tal flexibilidade permite que Oct-1 adote diferentes conformações de acordo com os diferentes sítios de ligação ao DNA (CLEARY e HERR, 1995). Oct-1 pode exercer múltiplas funções durante o desenvolvimento e também no adulto. Existem evidências de que os fatores de transcrição da família POU desempenham papel na inibição e promoção da proliferação celular, e na determinação de linhagens celulares, bem como na migração, sobrevivência e na diferenciação das células (ANDERSEN e ROSENFELD, 2001).

O sítio de ligação da topoisomerase II ao DNA também foi reconhecido no estudo de Jbilo *et al.* (1994). Tal enzima desempenha papel essencial na replicação, aliviando a tensão produzida pela abertura da forquilha de replicação, através da produção de cortes em ambas as fitas de DNA, introduzindo ou retirando espiras conforme a necessidade da célula, de acordo com a fase do ciclo celular.

A região 3'UTR do gene *BCHE* também foi relacionada a regulação da expressão através de MicroRNAs (miRs). Hanin e Soreq (2011) sugeriram que a região 3'UTR é alvo de pelo menos 116 miRs que podem estar agindo como silenciadores do mRNA de *BCHE*. Neste mesmo estudo foi relatado que a resposta de *BCHE* a glicocorticóides é especialmente influenciada por miRs. Sabe-se que os glicocorticóides possuem efeito na gliconeogênese, hiperglicemia, lipólise e distribuição da gordura corporal (PECKETT *et al.*, 2011). Deste modo, é possível que polimorfismos do gene, influenciem na afinidade destes MiRs levando a alterações em respostas metabólicas envolvidas em tais processos.

### **2.2.5 Variantes do gene *BCHE*: -116A e 1914G**

A primeira variante genética do gene *BCHE* foi descoberta após o uso de succinilcolina, que consiste de um bloqueador neuromuscular despolarizante, administrado em procedimentos de anestesia, atuando como relaxante muscular (KALOW e GENEST, 1957). Alguns indivíduos que possuem uma determinada

variante da BChE são incapazes de hidrolizar a succinilcolina, o que acarreta apnéia respiratória e paralisia muscular, quando submetidos a tratamentos com a dose fisiológica padrão (HARRIS e WHITTAKER, 1961).

Atualmente, diversas variantes já foram identificadas para o gene *BCHE*. Uma das mais frequentes é a mutação de ponto no nucleotídeo 1615 (GCA → ACA; A539T), no éxon 4, que resulta em uma substituição no códon 539 (Ala-Thr<sup>539</sup>), a enzima resultante é conhecida como “variante *K*”. Esta variante foi descrita pela primeira vez no trabalho de Rubinstein, Dietz e Lubrano (1978), que constataram que a variante era encontrada numa quantidade 33% menor na circulação, quando comparada à enzima usual. Altamirano, Bartels e Lockridge (2000) verificaram que não houve diferença na afinidade enzimática, taxa de catálise de substratos, taxa de secreção da célula e formação de tetrâmeros, quando comparadas a variante *K* e a enzima usual, propondo então que a alteração nos níveis de BChE circulante causados pela variante *K*, poderia estar associada a variação na região regulatória ou promotora do gene.

Na região não codificadora do gene *BCHE* no éxon 1 existe um sítio polimórfico no nucleotídeo -116 (TGC/TAC), conhecido como variante -116A com frequência de cerca de 8% em população norte-americana (BARTELS *et al.*, 1990) e euro-brasileira (FURTADO-ALLE *et al.*, 2008). Foi constatado que a variante -116A é preferencialmente encontrada em combinação cis com a 1615A (BARTELS *et al.*, 1990). Furtado-Alle *et al.* (2008) propuseram que a baixa atividade antes atribuída à presença da mutação 1615A deve-se a presença conjunta da 1615A com -116A, pois quando apenas a mutação 1615A está presente, não há alteração na atividade da BChE. Os autores sugerem que a mutação -116A interfere na ligação de elementos reguladores na transcrição e/ ou tradução do gene *BCHE*, já que a região 5' UTR do mRNA inclui a região -116.

Bartels *et al.*, (1990) descreveram um polimorfismo na região 1914 (A/G) da *BCHE*, no éxon 4. Similarmente à -116A, é encontrada em região não codificadora (189 nucleotídeos após o códon de parada de tradução). Este polimorfismo apresenta desequilíbrio de ligação com a variante -116A e também com a 1615A, exibindo configuração cis com estas. Esses dados sugerem que a diminuição da atividade enzimática da BChE pode ser atribuída à interação entre variantes e não apenas a um único polimorfismo dos que estão presentes.

### 2.2.6 Loco *CHE2*

Além de apresentar formas diversas, devido às variantes codificadas pelo gene *BCHE*, a variabilidade da enzima BChE pode ser influenciada pelo loco *CHE2* (2q33-q35). Em eletroforese bidimensional de gel de amido, além das bandas C<sub>1</sub> a C<sub>4</sub>, Harris, Hopkinson e Robson (1962) encontraram uma banda que foi denominada C<sub>5</sub>. Essa banda foi encontrada em apenas 4,6% da amostra e o gene responsável pela sua determinação foi chamado *CHE2*, apresentando os alelos *CHE2*\*C5+ e *CHE2*\*C5– responsáveis, respectivamente, pela presença e pela ausência da banda C<sub>5</sub>. Chautard-Freire-Maia *et al.* (1991) encontraram, em amostra da população de Curitiba/ PR, o fenótipo CHE2 C5+ com frequência de 10,3%, sendo que esses indivíduos apresentam atividade enzimática da BChE cerca de 30% superior a de indivíduos CHE2 C5–.

O loco *CHE2* codifica uma substância cuja natureza permanece desconhecida, que se liga à enzima, sendo responsável pelo surgimento da forma heteróloga da BChE, evidenciada pela banda eletroforética C<sub>5</sub>, a qual Masson (2001) sugeriu que seja formada pelo tetrâmero G4 associado com outra proteína ainda desconhecida; e apesar dos resultados obtidos nesse estudo não permitirem identificar a substância codificada pelo loco *CHE2*, várias hipóteses (albumina, imunoglobulina, híbrido de AChE/BChE, colágeno, fibronectina e fosfolípídeo) puderam ser descartadas. Li *et al.* (2008) identificaram o gene *RAPH1* (Ras-associated and PH domains, que codifica a lamelipodina) como um bom candidato para produzir esta substância que se liga a BChE na forma C<sub>5</sub>.

Os indivíduos CHE2 C5+ são menos sensíveis à succinilcolina, ou seja, a duração do efeito da droga é menor que os indivíduos CHE2 C5– (SUGIMORI, 1986). Alcântara *et al.* (2001) analisando dados dos fenótipos C<sub>5</sub>, demonstraram que a média de IMC de CHE2 C5+ é menor que CHE2 C5–, o que sugere a influência do loco *CHE2* no metabolismo de lipídeos.

## 2.3 BChE e a Síndrome Metabólica

Muitos estudos associaram determinados polimorfismos genéticos aos componentes de fatores de risco da síndrome metabólica. Os genes que podem

estar envolvidos na etiologia da SM podem estar relacionados à secreção de insulina (ex: glucoquinase) e regulação do metabolismo de carboidratos e gorduras (ZIMMET *et al.*, 1999). A atividade da BChE mostrou-se correlacionada positivamente com peso e negativamente com altura, indicando aí sua correlação com o índice de massa corporal (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991). Alcântara (2000) verificou uma maior frequência de bandas extras da BChE em obesos do que na população geral, sugerindo um papel do gene *BCHE* na determinação genética da obesidade. Segundo Souza *et al.* (2005), a *BCHE* pode estar relacionada com o metabolismo de lipídeos, uma vez que variantes do nucleotídeo 1615 do gene *BCHE* afetam diferentemente a variância do IMC. Furtado-Alle *et al.* (2008) investigando a associação do IMC com variantes do nucleotídeo -116, no qual a mutação -116A se apresenta preferencialmente em conformação cis com a 1615A demonstraram que a mutação está associada a um menor IMC e menor atividade da BChE, sendo que essa diminuição anteriormente atribuída somente a variante *K* (A539T), ocorre devido à presença concomitante das duas mutações.

A interação dos produtos dos genes *BCHE*, que codifica a BChE, e do loco *CHE2*, condicionando o fenótipo CHE2 C5+, está associado com peso e IMC mais baixos do que o fenótipo CHE2 C5- (CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991). É esperado também que o fenótipo CHE2 C5+, determine maior atividade enzimática da BChE (ACÂNTARA *et al.*, 2001).

Benyamin *et al.* (2011) demonstraram correlação positiva entre atividade da BChE e SM, sendo que a correlação mais intensa foi com os fatores níveis de triglicerídeos e IMC.

Boberg *et al.* (2010) demonstraram que indivíduos obesos possuem atividade da BChE significativamente maior que não-obesos, entretanto evidenciaram não haver diferença significativa entre IR das formas moleculares de obesos e não-obesos, sugerindo então que a regulação nos níveis específicos de cada forma molecular, pode ser importante para a função da BChE.

Kálmán *et al.* (2004) encontraram associação positiva entre atividade da BChE plasmática e níveis de colesterol e triglicerídeos séricos, sugerindo que a expressão do gene *BCHE* seja regulada positivamente pela hiperlipidemia.

### 3 OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

Realizar estudo de associação entre variáveis da BChE e SM em amostra de funcionários da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

#### 3.2 Objetivos específicos

- 1) Investigar associação entre as variantes *-116A* e *1914G* do gene *BCHE*, e variáveis bioquímicas (colesterol, glicemia, triglicerídeos, HDL e LDL-colesterol), e antropométricas (IMC) relacionadas à obesidade.
- 2) Investigar associação entre a atividade da BChE e variáveis relacionadas à obesidade, que indicam risco de desenvolvimento de SM.
- 3) Investigar associação entre as formas moleculares da BChE e variáveis que relacionadas à obesidade, que indicam risco de desenvolvimento de SM.
- 4) Investigar associação entre os fenótipos CHE2 C5+ e CHE2 C5-, e variáveis que indicam risco de desenvolvimento de SM.

## 4 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em dois capítulos e cada um deles na forma de artigo. O primeiro artigo relaciona variantes genotipadas dos SNPs -116 e 1914 do gene *BCHE* e atividade enzimática total da BChE, com variáveis antropométricas e bioquímicas. O segundo trata das diferenças bioquímicas observadas entre homens e mulheres, investiga atividades totais e relativas da BChE na amostra dividida em grupos de obesos e não obesos, grupos de homens e mulheres e de portadores do fenótipo CHE2 C5+ e CHE C5-. Correlaciona também variáveis antropométricas e bioquímicas com atividade total e relativa das formas moleculares da BChE.

### 4.1 ARTIGO 1: **1914G VARIANT OF *BCHE* GENE ASSOCIATED WITH ENZYME ACTIVITY, OBESITY AND TRIGLYCERIDES LEVELS**

**ABSTRACT:** Polymorphisms of butyrylcholinesterase (BChE) have been reported to be associated to weight, BMI variance and hypertriglyceridemia in adults and adolescents. The aim of the present study was to investigate the association of -116A (SNP: G/A; rs1126680) and 1914G (SNP: A/G; rs3495) variants of *BCHE* gene with anthropometric and biochemical variables associated with obesity in population sample with 115 individuals, from Southern Brazil. Participants were divided into two groups: obese (BMI  $\geq 30$ ) and non-obese (BMI  $< 30$ ). The 1914G allele showed significantly higher frequency in the obese group, and carriers of 1914G allele showed lower mean BChE activity when compared to 1914A carriers ( $p=0.006$ ). Higher means of BMI ( $p = 0.02$ ) and triglyceride (TG;  $p=0.01$ ) were found in 1914G carriers (BMI= 27.57Kg/m<sup>2</sup>; TG= 150.8mg/dL) when compared to 1914A homozigotes (BMI= 25.55 Kg/m<sup>2</sup>; TG= 107.9 mg/dL). Carriers of the -116A allele showed lower mean BChE activity than usual homozigotes, and the -116A variant was found in cis with 1914G ( $p<0.0001$ ;  $D'=1$ ). Considering that the region of *BCHE* gene that contains the 1914G mutation site is target of MicroRNAs (miRs) and that the response of BChE to glucocorticoids is especially influenced by these miRs, it is possible that BChE can be interfering in gluconeogenesis, hyperglycemia, lipolysis and body fat distribution, especially when the 1914G allele decreases BChE activity. This lower activity may cause an imbalance in lipid metabolism, which may lead to an increased predisposition to obesity and to a lower ability to maintain the metabolic homeostasis under the effect of it.

**KEYWORDS:** BChE activity, Obesity, -116A variant, 1914G variant, body mass index.

## INTRODUCTION

Butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is a serine hydrolase which is related to lipid metabolism and has been associated to metabolic syndrome risk variables, such as body mass index (BMI), waist-hip ratio, waist circumference, weight, cholesterol and triglyceride levels (Alcantara et al., 2005; Benyamin et al., 2011; Furtado-Alle et al., 2008; Iwasaki et al., 2007; Randell et al., 2005; Souza et al., 2005).

The non-coding exon 1 of the *BCHE* gene (3q26.1-q26.2) contains a SNP at -116 site (SNP: G/A; rs1126680), being the -116A allele identified with a frequency of 8% (Bartels et al., 1990) and associated with lower enzyme activity (Furtado-Alle et al., 2008) and to hypertriglyceridemia in obese adolescents (Chaves et al., 2012). The second *BCHE* polymorphism investigated in this study is located at exon 4, also in a non-coding region (5'UTR, 189 bases after the stop codon) at 1914 site (SNP: A/G; rs3495). The 1914G allele was originally described with a frequency of 26%, being found in cis with the -116A allele (Bartels et al., 1990).

This study measured the enzymatic activity of BChE in a sample of 111 adults from Curitiba, Brazil, correlating it with the SNPs -116A and 1914G of *BCHE* gene, and also verifying their influence on anthropometric and biochemical variables associated with obesity.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

The sample consisted of 115 individuals from Southern Brazil (all Euro-Brazilian, 35% men and 65% women), 27 of which are obese (BMI  $\geq 30$  kg/m<sup>2</sup>) and 88 non-obese (BMI  $< 30$  kg/m<sup>2</sup>). Weight and height were measured with accuracy of 0.1 kg and 0.1 cm, respectively. The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná.

### DNA and plasma analysis

DNA extraction was performed by a salting-out method (Lahiri and Nurnberger, 1991) and then diluted to a final concentration of 20 ng/μL. Was performed genotyping of variants located in exons 1 and 4 (rs1126680 and rs3495



respectively) by TaqMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). The reactions were performed in a *Mastercycler realplex 2* according to the following steps: (1) 50°C/2 min., (2) 95°C/10 min., (3) repeat 50 times 95°C/15 sec., interspersed by 62°C/min.

The plasma BChE activity was measured using propionylthiocholine as substrate at 25°C (Dietz et al., 1972). Glucose, triglycerides, total cholesterol and fractions were measured by standard automated methods.

### Statistical Analysis

Frequency distributions, mean  $\pm$  S.E., variances and t-test were calculated using Statistica for Windows (StatSoft Inc. 1996, Version 5.0).  $\chi^2$  tests were performed using Clump (Sham and Curtis, 1995). Multiple regression analysis was performed by using SPSS for Windows (SPSS Inc. Released 2004, Version 13.0, Chicago).

## RESULTS

The genotype distributions are in Hardy-Weinberg equilibrium in both sites (-116 and 1914). Table 1 summarizes the results of allele frequency of the studied variants in the total sample, and in obese and non-obese. The -116A allele was found with similar frequency between obese and non-obese ( $\chi^2 = 0.02$ ,  $p = 0.87$ ). The 1914G allele was found with different frequencies between obese and non-obese ( $\chi^2 = 5.21$ ,  $p = 0.02$ ). Since the frequency of the 1914G allele was significantly higher in the obese group, a multiple regression analysis was conducted, considering sex, age, and variants of the site -116 and 1914 as independent variables and obesity as the dependent variable. This result confirmed that the 1914G allele acts as an independent factor in the increase of BMI ( $\beta = -1.99 \pm 0.76$ ,  $p = 0.01$ ). The age factor was also significant ( $\beta = 0.18 \pm 0.06$ ,  $p = 0.003$ ), in agreement with what has been described in the literature, the BMI increases on average with advancing age (Rodgers, 2002; Walsh et al., 2011).

TABLE 1: Allele frequencies of -116A and 1914G SNPs (%  $\pm$  standard error) in the total sample, in obese and in non-obese individuals

	<b>Total (n=115)</b>	<b>Obese (n=27)</b>	<b>Non-obese (n=88)</b>
<b>-116</b>	A = 6.96 $\pm$ 1.67	A = 5.56 $\pm$ 3.12	A = 7.83 $\pm$ 2.94
	G = 93.04 $\pm$ 1.67	G = 94.44 $\pm$ 3.12	G = 92.17 $\pm$ 2.94
<b>1914</b>	A = 40.09 $\pm$ 3.29	A = 25.93 $\pm$ 5.96	A = 44.64 $\pm$ 3.83
	G = 59.91 $\pm$ 3.29	G = 74.07 $\pm$ 5.96	G = 55.36 $\pm$ 3.83

Table 2 shows comparisons between the genotypes of the -116A and 1914G variants, mean BChE activity and BMI. The activity was significantly lower in -116A allele carriers than in usual homozygotes. The activity was also significantly lower in carriers of 1914G allele when compared to usual homozygotes. Higher mean BMI was found in individuals 1914G homozygote when compared to 1914A homozygotes. There was no significant difference in mean BMI when comparing usual homozygotes and carriers of -116A allele.

TABLE 2: Comparisons of mean ( $\pm$  standard error) BChE activity (KU/L) and BMI (kg/m<sup>2</sup>) between mutant allele carriers and homozygotes for the usual alleles for -116 and 1914 sites of *BCHE* gene.

	<b>1914 AG + 1914 GG</b>	<b>1914 AA</b>	<b>t (p)</b>
BChE activity	4.21 $\pm$ 1.20	5.06 $\pm$ 1.71	t=2.80 e p=0.006*
BMI	27.57 $\pm$ 4.86	25.55 $\pm$ 3.37	t=2.34 e p=0.02*
	<b>-116 AG + -116 AA</b>	<b>-116 GG</b>	
BChE activity	3.59 $\pm$ 1.31	4.54 $\pm$ 1.14	t=2.59 e p=0.01*
BMI	27.61 $\pm$ 4.32	26.85 $\pm$ 4.74	t=-0.58 e p=0.56

\* Significant values

Considering that linkage disequilibrium analysis confirmed that the variant -116A is in cis with 1914G ( $\chi^2 = 17.25$ ,  $p < 0.0001$ ,  $D' = 1$ ), the biochemical variables (total cholesterol, LDL and HDL-cholesterol, triglycerides and glycemia) were analyzed considering both sites, by comparing carriers of both variants and usual homozygotes for both sites. Higher triglyceride levels were found in carriers of both variants (150.8 mg/dL) when compared with homozygotes for -116G and 1914A alleles (107.9 mg/dL; t=-2.58, p=0.01).

## DISCUSSION

Although the role of BChE in metabolic pathways is not fully elucidated, it has been proposed that it could be responsible for the hydrolysis of choline esters, which are products of the free fatty acids metabolism and liver lipogenesis (Chu et al., 1978; Clitherow et al., 1963; Kutty et al., 1981; Siskova et al., 2012). In obese individuals, there is a tendency of the BChE activity to be higher than in non-obese, which is probably related to the increased availability of free fatty acids characteristic of obesity (Alcantara et al., 2005; Furtado-Alle et al., 2008; Randell et al., 2005). Former studies have associated *BCHE* gene variants, including -116A variant, with obesity and lipid and biochemical profiles (Benyamin et al., 2011; Furtado-Alle et al., 2008; Scacchi et al., 2011).

The lower mean BChE activity in carriers of allele -116A found in this study sample agrees with the results of previous studies (Chaves et al., 2012). It is noteworthy that our study is the first to consider the 1914G mutation in this context, and our findings suggest that the 1914G variant is associated to higher BMI and triglyceride levels and to lower BChE activity. Knowing that the -116A is less frequent than 1914G (table1), and that both alleles are found in cis, due to their linkage disequilibrium, it is possible that the lower BChE activity, attributed originally to the -116A allele, is caused by 1914G allele concomitant presence.

It was reported that 3'UTR region of BChE is target of at least 116 MicroRNAs (miRs) that may act as silencers of mRNA BChE (Hanin and Soreq, 2011). This region contains the site of the 1914G variant, which can be influencing the affinity of these miRs, and therefore changing the levels of enzyme produced. In the same study (Hanin and Soreq, 2011) it was found that the response of BChE to glucocorticoids is especially influenced by these miRs. Knowing that the glucocorticoids have an effect on gluconeogenesis, hyperglycemia, lipolysis and body fat distribution (Peckett et al., 2011), BChE can be interfering in these metabolic pathways, especially when the 1914G allele decreases BChE activity. This lower activity may cause an imbalance in lipid metabolism, which may lead to an increased predisposition to obesity and to a lower ability to maintain the metabolic homeostasis under the effect of it.

The *K* variant (SNP: G/A; rs1803274; p.A539T; 1615 nt) of the *BCHE* gene is the most common variant of the coding region and has been associated with higher

BMI variance. It was shown that, although the *K* variant was originally associated to lower BChE activity, it is not associated with decreased BChE activity by itself, being the -116A variant necessary for this decrease (Furtado-Alle et al., 2008). Considering that the alleles -116A, *K* and 1914G are preferentially found in cis and the lack of studies with the 1914G variant, it is possible that this variant is essential to regulate BChE activity and obesity related variables. Facing our results, we suggest that the 1914G allele has a fundamental influence in BChE activity levels, and consequently in the metabolic processes it participates.

## References

- Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA (2005). Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clin Chem Lab Med*, 43 285-288
- Souza RL, Mikami LR, Maegawa RO, Chautard-Freire-Maia EA (2005). Four new mutations in the BCHE gene of human butyrylcholinesterase in a Brazilian blood donor sample. *Mol Genet Metab*, 84 349-353
- Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G (2005). Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clin Biochem*, 38 799-805
- Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA (2008). Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chem Biol Interact*, 175 115-118
- Iwasaki T, Yoneda M, Nakajima A, Terauchi Y (2007). Serum butyrylcholinesterase is strongly associated with adiposity, the serum lipid profile and insulin resistance. *Intern Med*, 46 1633-1639
- Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA, Valle AM, Gordon S, Nyholt DR, Medland SE, Henders AK, Heath AC, Madden PA *et al* (2011). GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Hum Mol Genet*, 20 4504-4514
- Bartels CF, van der Spek AF, La Du BN (1990). Two polymorphisms in the non-coding regions of the BCHE gene. *Nucleic Acids Res*, 18 6171
- Chaves TJ, Leite N, Milano GE, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA, Furtado-Alle L (2012). -116A and K BCHE gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. *Chem Biol Interact*, 191
- Lahiri DK, Nurnberger JI, Jr. (1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*, 19 5444
- Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T, Hodges LK (1972). Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *Am J Hum Genet*, 24 58-64
- Sham PC, Curtis D (1995). Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann Hum Genet*, 59 97-105
- Rodgers A: Reducing Risks, Promoting Healthy Life. In: *The World Health Report 2002*. Edited by Report WH. Switzerland; 2002: 248.
- Walsh JC, M. Heazlewood, I. T. Burke, S. Kettunen, J. Adams, K. J. & DeBeliso, M. (2011). The Loess Regression Relationship Between Age and BMI for both Sydney World Masters Games Athletes and the Australian National Population. *International Journal of Biological and Medical Sciences*, 1 4

- Clitherow JW, Mitchard M, Harper NJ (1963). The Possible Biological Function of Pseudocholinesterase. *Nature*, 199 1000-1001
- Kutty KM, Huang SN, Kean KT (1981). Pseudocholinesterase in obesity: hypercaloric diet induced changes in experimental obese mice. *Experientia*, 37 1141-1142
- Chu MI, Fontaine P, Kutty KM, Murphy D, Redheendran R (1978). Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. *Clin Chim Acta*, 85 55-59
- Siskova K, Bilka F, Adameova A, Balazova A, Mydla M, Paulikova I (2012). Influence of lipid imbalance on butyrylcholinesterase activity and biotransformation efficiency. *Pharmazie*, 67 345-350
- Scacchi R, Ruggeri M, Corbo RM (2011). Variation of the butyrylcholinesterase (BChE) and acetylcholinesterase (AChE) genes in coronary artery disease. *Clin Chim Acta*, 412 1341-1344
- Hanin G, Soreq H (2011). Cholinesterase-Targeting microRNAs Identified in silico Affect Specific Biological Processes. *Front Mol Neurosci*, 4 28
- Peckett AJ, Wright DC, Riddell MC (2011). The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. *Metabolism*, 60 1500-1510

## 4.2 ARTIGO 2: BUTYRYLCHOLINESTERASE AND VARIABLES RELATED TO OBESITY IN A POPULATION SAMPLE FROM SOUTHERN BRAZIL

**ABSTRACT:** This study investigated the relation of absolute (TA) and relative (RA) activity of molecular forms (G1, G1-Alb, G2, G3 and G4) of plasma butyrylcholinesterase (BChE) with anthropometric and biochemical variables related to obesity in a population sample from Southern Brazil (n = 290). TA of BChE was positively correlated with BMI, total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides and glucose levels, and negatively with HDL-cholesterol. Obese had higher TA and RA of the G4 band than non obese. Men showed higher means of TA, RA of the G1 band, G1-alb and G2 than women. CHE2 C5+ individuals showed TA and RA of all molecular forms higher than CHE2 C5-. Thus, it is possible to associate the increase in plasma BChE activity with metabolic stress caused by obesity and, taking into account gender and CHE2 phenotype, plasma BChE activity can be used as a secondary marker for the risks associated with obesity.

**KEYWORDS:** butyrylcholinesterase, obesity, lipid metabolism

### 1. Introduction

Butyrylcholinesterase (BChE; EC 3.1.1.8) is coded by *BCHE* gene (3q26.1), synthesized in the liver and distributed to several parts of the organism. Plasmatic BChE is found in four possible homomeric forms (G1 monomers, G2 dimmers, G3 trimers and G4 tetramers) and also associated with albumin (G1-Alb) [1]. Additionally, a protein binds to G4 and originates the C<sub>5</sub> band, which was found only in 10.3% in a Southern Brazilian sample [2]. The *CHE2* locus (2q33-35) is responsible for this still unknown protein and determines two phenotypes CHE2 C5+ and CHE2 C5- characterized by the presence and the absence of the C<sub>5</sub> band [3]. BChE has been associated with lipid metabolism, as demonstrated in studies including BMI [4], waist-hip ratio [5], abdominal circumference [6], weight [7], HDL and LDL cholesterol [8], and triglyceride levels [9]. Several studies indicate that BChE activity is positively correlated with weight, obesity and BMI [2, 10, 11]. It is noteworthy that although CHE2 C5+ individuals have BChE activity 30% higher than CHE2 C5- they have lower means of BMI and weight, suggesting that the presence of C<sub>5</sub> band has a protective effect against obesity [2, 12, 13].

The aim of this study was to compare the relative and total activity of BChE isoforms between obese and non obese, men and women, and CHE2 C5+ and CHE2 C5- individuals and investigate their relation with anthropometric and biochemical variables related to obesity.

## **2. Methods**

### **2.1. Sample**

The sample comprised 290 adults, Euro-brazilian from Southern Brazil (31.72% male and 68.28% female). Subjects were considered obese with BMI greater than or equal to 30 kg/m<sup>2</sup> and non-obese with BMI less than 30 kg/m<sup>2</sup>. 25.15% of the women in the sample were categorized as obese, and 74.85% non-obese, among men 22.86% are obese and 77.14% non-obese. The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná.

### **2.2. Detection of BChE bands and plasma analysis**

The detection and analysis of BChE bands in plasma was made according to Boberg *et al.* (2010) [14]. Samples without any detectable BChE band were excluded from the analysis.

Plasma BChE activity was measured according to Dietz *et al.* (1972) [15], with modifications [16]. Glucose, triglycerides, total cholesterol and fractions were measured by standard automated methods.

### **2.3. Statistical Analysis**

Means (M) ± Standard Deviations (SD), variances, Mann–Whitney U test, F-test, Spearman's correlation, and multiple regression analysis were calculated using Statistica for Windows (StatSoft Inc. 1996 Version 5.0).



### 3. Results and Discussion

Men and women differed significantly in the biochemical variables HDL-cholesterol, triglycerides and glucose (table 1). It is known that women generally have higher levels of HDL than men and therefore lower risks of diseases associated with lipid metabolism [17]. HDL levels considered at risk for women are below 50 mg/dL, and for men, below 40 mg/dL [18]. Other studies have also found differences in the triglyceride levels between men and women, suggesting that, independently of the amount of body fat, the centripetal distribution of body fat, more common in men, may contribute to the appearance of hypertriglyceridemia [19]. It is reported, in some studies, that despite glucose intolerance is more prevalent in women than in men, men present a mean fasting glucose greater than women, and some studies suggest it may be related to differences in body size between men and women [20, 21].

**Table 1** - Means (M)  $\pm$  Standard Deviations (SD) and U-tests (of Mann-Whitney) results of variables in the sample.

Variables	Men	Women	U-test (Z; p)
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	26.97 $\pm$ 4.16	26.95 $\pm$ 5.22	0.44; p=0.65
Total cholesterol (mg/dL)	209.82 $\pm$ 37.08	205.29 $\pm$ 38.72	0.78; p=0.44
HDL-C (mg/dL)*	43.55 $\pm$ 9.01	53.71 $\pm$ 13.42	-5.81; p<10 <sup>-6</sup> *
LDL-C (mg/dL)	134.92 $\pm$ 33.22	129.08 $\pm$ 32.03	1.08; p=0.28
Triglycerides (mg/dL)*	156.00 $\pm$ 80.16	117.84 $\pm$ 57.64	3.50; p=0.0004*
Glucose (mg/dL)*	86.32 $\pm$ 10.44	83.48 $\pm$ 18.82	2.86; p=0.004*
Age (years)*	42.19 $\pm$ 9.84	46.57 $\pm$ 10.75	-2.33; p=0.02*

\* significant differences

To determine which variables could be considered as independent factors for increased lipid fractions and fasting glucose, multiple regression analysis was performed considering as independent variables gender, BMI and the absolute and relative activities of BChE. The results showed that gender and BMI are significant factors for increasing of HDL fractions (gender:  $\beta = 9,12 \pm 1,89$ ;  $p < 10^{-5}$  e BMI:  $\beta = -0,69 \pm 1,81$ ;  $p = 0,0007$ ) and triglycerides (gender:  $\beta = 3,67 \pm 0,95$ ;  $p = 0,0001$  e BMI:  $\beta = -31,76 \pm 9,85$ ;  $p = 0,001$ ). For glucose only BMI was significant ( $\beta = 1,25 \pm 0,024$ ;  $p < 10^{-5}$ ).

**Table 2** – Results of Spearman's correlation (rank R) between BChE total activity (TA) and relative activity of molecular forms and anthropometric and biochemical variables. Are represented the significant correlations ( $p < 0.05$ ).

<b>Molecular forms</b>					
<b>Variables (total sample)</b>	<b>G1</b>	<b>G1-alb</b>	<b>G2</b>	<b>G4</b>	<b>TA</b>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0,1392	ns	ns	0,1352	0,1987
Total colestherol (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	0,1581
HDL-C (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	-0,1506
LDL-C (mg/dL)	ns	ns	ns	0,1630	0,1920
Triglycerides (mg/dL)	0,1446	ns	ns	ns	0,1698
Glucose (mg/dL)	0,2410	0,2611	ns	ns	0,2072
Age (years)	0,2639	0,1925	ns	0,2237	0,3370
<b>Men (n=92)</b>					
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	ns	ns	ns	ns	ns
Total colestherol (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
HDL-C (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
LDL-C (mg/dL)	ns	ns	ns	0,2480	0,3125
Triglycerides (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
Glucose (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
Age (years)	ns	ns	ns	ns	ns
<b>Women (n=198)</b>					
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	0,2267	0,1876	ns	0,2183	0,3025
Total colestherol (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
HDL-C (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
LDL-C (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
Triglycerides (mg/dL)	ns	ns	ns	ns	ns
Glucose (mg/dL)	0,2834	0,2888	ns	ns	0,2552
Age (years)	0,3687	0,2342	0,2073	0,3495	0,4800

ns = not significant

Correlation data between anthropometric and biochemical variables with relative and absolute activities (table 2) showed that in the total sample the total

activity (TA) was correlated with all variables analyzed. However, when it was separated men and women, total cholesterol, HDL and triglycerides did not show the same relation. BMI and age were significantly correlated with relative activity (RA) of the G4 in total sample and in women. G4 also was correlated with LDL in the total sample and in the men. These results indicate that although both genders present the same tendency, they differ in the degree or intensity of the relations found, being thus possible to verify the significant effect, only in one sex. Correlation was found only in women between G1-alb and BMI, and G2 and age. Glucose level was related with G1 and G1-alb, and IMC with G1, in the total sample and in women.

Table 3 summarizes the mean results of Relative Intensity (RI) and RA of BChE bands and results of test-T between obese and non-obese, men and women, and CHE2 C5+ and CHE2 C5- individuals. The differences observed in the RA of BChE bands between men and women (G1, G2 and G1-alb) are distinct of that found between obese and non-obese (G4), suggesting that gender and BMI interfere in the activity of BChE independently. Considering these data, it was performed multiple regression analyzes in which gender and BMI were considered as independent factors. BMI was significantly associated to the increase of total activity and of tetramer observed in obese ( $\beta = 0.07 \pm 0.004$ ;  $p = 0.01$ , and  $\beta = 0.028 \pm 0.014$ ;  $p = 0.02$ , respectively). The regression analysis also confirmed that gender is an independent factor for the increasead RA of G1 and G1-alb observed in men ( $\beta = -0.127 \pm 0.06$ ;  $p = 0.03$ , and  $\beta = 0.131 \pm 0, 04$ ;  $p = 0.002$ , respectively).

The TA and RA of all molecular forms were significantly higher in CHE2 C5+ individuals. The CHE2 C5+ phenotype has already been associated with a significant increase in the total activity of BChE [13]. It is known that the molecular forms of BChE are partially interconvertible [1] and also that the tetramer-associated protein, which determines the CHE2 C5+ phenotype, plays a role in tetramerization.

Boberg et al (2010) [14] found no significant differences in the RI of BChE bands between obese and non-obese men, and concluded that the high enzyme activity observed in the obese should be due to a higher proportion of molecular forms, which are adjusted to specific levels to maintain its RI regardless of BMI. Our results disagree with these authors [14] since the activity was not proportionately higher in the obese group in all molecular forms studied. This is possibly due to the fact that the previous study was conducted with a sample of men, in contrast to this work that constitutes a population sample. Considering the correlation of BMI and

glucose with monomer (G1), which is the more immediate molecular form of gene expression, it is possible that metabolic alterations interfere in the expression of the *BCHE* gene. Additionally, correlation analysis show that the G4 band increases more than other molecular forms in metabolic unfavorable situations, such as higher BMI and LDL levels, suggesting that tetramerization is important to the role of BChE in maintaining metabolic homeostasis under the stress cause by obesity.

Silva et al (2012) [22] investigated the activity of BChE and RI in obese adolescents before and after 12 weeks of physical exercise (PE) and observed that plasma BChE activity reduced significantly after PE, becoming similar to those of non-obese individuals. However, the RI of isoforms of BChE showed no significant differences before and after the program, agreeing with the results of Boberg et al (2010) [14]. The sample used in this study consisted of both the genders, but has included only teenagers. This may explain the discrepancy with our results, seeing that the age is a factor that can also act in BChE activity (table 2), and the sample used in our study consists of individuals of higher mean age (table 1).

In the present work we observe influence of gender, BMI and CHE2 phenotype in the modulation of enzymatic activity. Although other factors may be involved concomitantly, such as polymorphism of *BCHE* gene, it is possible to associate [11, 23, 24] the increase in plasma BChE activity with metabolic stress caused by obesity. Therefore, taking into account gender and CHE2 phenotype, plasma BChE activity can be used as a secondary marker of the risks associated with obesity.

**Table 3** - Means (M)  $\pm$  Standard Deviations (D) and t-test results of relative intensity (RI) and relative activity (RA) of BChE bands and comparisons between obese and non obese, man and women and CHE2 C5+ and CHE2 C5- individuals.

	Relative Intensity			Activity (KU/L)			Means ratio
	M $\pm$ SD		T (p)	M $\pm$ SD		T (p)	
	Obese	Unobese		Obese	Unobese		
TA				4.74 $\pm$ 1.45	4.50 $\pm$ 1.61	1.99 (0.04)*	1.05
G4	0.68 $\pm$ 0.15	0.65 $\pm$ 0.13	1.46 (0.16)	3.21 $\pm$ 1.17	2.87 $\pm$ 0.97	2.20 (0.03)*	1.12
G2	0.11 $\pm$ 0.05	0.13 $\pm$ 0.06	-1.87 (0.06)	0.54 $\pm$ 0.32	0.62 $\pm$ 0.49	-1.03 (0.30)	0.87
G1-alb	0.09 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.04	-0.97(0.33)	0.46 $\pm$ 0.30	0.47 $\pm$ 0.29	-0.25 (0.80)	0.98
G1	0.11 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.06	-0.58 (0.56)	0.52 $\pm$ 0.39	0.54 $\pm$ 0.41	-0.24 (0.81)	0.96
	<b>Men</b>	<b>Women</b>		<b>Men</b>	<b>Women</b>		
TA				4.92 $\pm$ 1.94	4.46 $\pm$ 1.35	2.30 (p=0.02)*	1.10
G4	0.63 $\pm$ 0.13	0.66 $\pm$ 0.13	-1.87 (p=0.06)	3.03 $\pm$ 1.11	2.92 $\pm$ 0.98	0.85 (p=0.40)	1.04
G2	0.13 $\pm$ 0.06	0.12 $\pm$ 0.06	0.81 (p=0.41)	0.68 $\pm$ 0.59	0.57 $\pm$ 0.36	1.96 (p=0.05)*	1.19
G1-alb	0.11 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.04	2.32 (p=0.02)*	0.56 $\pm$ 0.35	0.44 $\pm$ 0.25	3.09 (p=0.002)*	1.27
G1	0.13 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.06	1.88 (p=0.06)	0.64 $\pm$ 0.48	0.51 $\pm$ 0.35	2.60 (p=0.01)*	1.25
	<b>CHE2 C5+</b>	<b>CHE2 C5-</b>		<b>CHE2 C5+</b>	<b>CHE2 C5-</b>		
TA				5.28 $\pm$ 2.28	4.47 $\pm$ 1.35	3.26 (p=0.001)*	1.18
G4	0.64 $\pm$ 0.13	0.66 $\pm$ 0.14	-0.90 (p=0.37)	3.26 $\pm$ 1.24	2.89 $\pm$ 0.96	2.27 (p=0.02)*	1.13
G2	0.14 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.06	1.35 (p=0.18)	0.78 $\pm$ 0.73	0.57 $\pm$ 0.36	2.83 (0.005)*	1.37
G1-alb	0.10 $\pm$ 0.04	0.10 $\pm$ 0.04	0.18 (p=0.85)	0.55 $\pm$ 0.35	0.46 $\pm$ 0.28	1.91 (p=0.05)*	1.18
G1	0.12 $\pm$ 0.05	0.11 $\pm$ 0.06	0.72 (p=0.47)	0.68 $\pm$ 0.51	0.53 $\pm$ 0.36	2.41 (p=0.02)*	1.28

\* significant differences

## References:

- [1] Masson P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. *Biochimica et biophysica acta* 1989;998:258-266.
- [2] Chautard-Freire-Maia EA, Primo-Parmo SL, Picheth G, Lourenco MA, Vieira MM. The C5 isozyme of serum cholinesterase and adult weight. *Human heredity* 1991;41:330-339.
- [3] Harris H, Hopkinson DA, Robson EB. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in normal human serum. *Nature* 1962;196:1296-1298.
- [4] Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. *Clinical chemistry and laboratory medicine : CCLM / FESCC* 2005;43:285-288.
- [5] Calderon-Margalit R, Adler B, Abramson JH, Gofin J, Kark JD. Butyrylcholinesterase activity, cardiovascular risk factors, and mortality in middle-aged and elderly men and women in Jerusalem. *Clinical chemistry* 2006;52:845-852.
- [6] Randell EW, Mathews MS, Zhang H, Seraj JS, Sun G. Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. *Clinical biochemistry* 2005;38:799-805.
- [7] Souza RL, Fadel-Picheth C, Allebrandt KV, Furtado L, Chautard-Freire-Maia EA. Possible influence of BCHE locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. *American journal of physical anthropology* 2005;126:329-334.
- [8] Benyamin B, Middelberg RP, Lind PA et al. GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within BCHE and secondary associations with metabolic risk factors. *Human molecular genetics* 2011;20:4504-4514.
- [9] Valle A, O'Connor DT, Taylor P, Zhu G, Montgomery GW, Slagboom PE, Martin NG, Whitfield JB. Butyrylcholinesterase: association with the metabolic syndrome and identification of 2 gene loci affecting activity. *Clinical chemistry* 2006;52:1014-1020.
- [10] Kutty KM. Biological function of cholinesterase. *Clinical biochemistry* 1980;13:239-243.

- [11] Furtado-Alle L, Andrade FA, Nunes K, Mikami LR, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Association of variants of the -116 site of the butyrylcholinesterase BCHE gene to enzyme activity and body mass index. *Chemico-biological interactions* 2008;175:115-118.
- [12] Alcantara VM, Rodrigues LC, Oliveira LC, Chautard-Freire-Maia EA. Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. *Human biology* 2001;73:587-595.
- [13] Alcantara VM, Oliveira LC, Rea RR, Suplicy HL, Chautard-Freire-Maia EA. Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the CHE2 C5+ and CHE2 C5- phenotypes. *International journal of obesity and related metabolic disorders : journal of the International Association for the Study of Obesity* 2003;27:1557-1564.
- [14] Boberg DR, Furtado-Alle L, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA. Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. *Genetics and molecular biology* 2010;33:452-454.
- [15] Dietz AA, Rubinstein HM, Lubrano T, Hodges LK. Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *American journal of human genetics* 1972;24:58-64.
- [16] Evans RT, Wroe J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clinical chemistry* 1978;24:1762-1766.
- [17] Kaji H. High-density lipoproteins and the immune system. *Journal of lipids* 2013;2013:684903.
- [18] Grundy SM, Brewer HB, Jr., Cleeman JI, Smith SC, Jr., Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation* 2004;109:433-438.
- [19] Seidell JC, Cigolini M, Charzewska J, Ellsinger BM, Bjorntorp P, Hautvast JG, Szostak W. Fat distribution and gender differences in serum lipids in men and women from four European communities. *Atherosclerosis* 1991;87:203-210.
- [20] Faerch K, Borch-Johnsen K, Vaag A, Jorgensen T, Witte DR. Sex differences in glucose levels: a consequence of physiology or methodological convenience? The Inter99 study. *Diabetologia* 2010;53:858-865.
- [21] Janghorbani M, Amini M. Effects of gender and height on the oral glucose tolerance test: the isfahan diabetes prevention study. *The review of diabetic studies : RDS* 2008;5:163-170.

- [22] Silva IM, Leite N, Boberg D, Chaves TJ, Eisfeld GM, Bono GF, Souza RL, Furtado-Alle L. Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. *Genetics and molecular biology* 2012;35:741-742.
- [23] Çokuğraş AN. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. *Turk J Biochem* 2003;28:7.
- [24] Chaves TJ, Leite N, Milano GE, Souza RL, Chautard-Freire-Maia EA, Furtado-Alle L. -116A and K BCHE gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. *Chemico-biological interactions* 2012;191.



## 5 DISCUSSÃO GERAL

Este estudo investigou a associação entre variáveis da butirilcolinesterase e fatores de risco para desenvolvimento de síndrome metabólica em amostra populacional. Os resultados permitiram perceber que a BChE está relacionada a algumas das variáveis estudadas, como níveis de triglicerídeos, LDL e IMC.

O alelo *1914G* foi encontrado com maior frequência no grupo de obesos que no grupo de não obesos, foi, portanto, associado a um maior IMC. Esteve também associado a uma menor atividade enzimática em relação aos homozigotos *1914AA*. É possível que a variante do sítio 1914 tenha influência nos níveis de atividade da BChE e, conseqüentemente nos processos metabólicos dos quais ela participa. Estudos envolvendo a variante *1914G* são escassos, e verificou-se neste estudo que seu papel provavelmente é de grande relevância, e sua associação com maior IMC consiste um achado importante. Existe possibilidade de que estudos anteriores envolvendo as variantes *1615A* e *-116A* sejam reflexo do efeito da *1914G* que se encontra em desequilíbrio de ligação com elas. Também é possível que estas três variantes apresentem efeito sinérgico na determinação dos níveis enzimáticos de BChE. Outra observação que deve ser ressaltada é que a presença do alelo *1914G* leva a um efeito contrário do que seria esperado na homeostase: a atividade é menor, apesar do IMC ser maior, sendo que na manutenção da homeostase espera-se que o aumento na disponibilidade de ácidos graxos livres acarrete hiperlipidemia e atividade aumentada da BChE (CHAVES *et al.*, 2012), e a tendência é, então, a de que indivíduos obesos apresentem atividade enzimática maior que não-obesos (ALCÂNTARA *et al.*, 2003; FURTADO-ALLE *et al.*, 2008).

As correlações positivas da atividade total da BChE com IMC, colesterol total, LDL, triglicerídeos e glicemia, e correlação negativa com HDL (tabela 2, artigo 2) demonstram que a atividade da BChE está relacionada com metabolismo de lipídeos e, portanto tem relação também com a síndrome metabólica.

Foram observadas diferenças significativas entre obesos e não obesos, quanto à atividade total e relativa do tetrâmero (G4). Atividades relativas de G1, G1-alb e G2, foram maiores nos homens que em mulheres. Ao se perceber que as diferenças entre homens e mulheres foram distintas das observadas entre obesos e não obesos, pode-se deduzir que gênero e IMC atuam na modulação da atividade da BChE. Sendo assim, pode-se verificar que diferenças observadas entre homens

e mulheres, devido a aspectos fisiológicos principalmente, são de grande relevância quando se trabalha com uma amostra populacional, sendo que tal distinção deve ser levada em consideração neste tipo de estudo.

As relações encontradas na amostra total entre IMC e atividade relativa de G1 e G4, glicemia e G1 e G1-alb, LDL e G4, triglicerídeos e G1, indicam que a enzima tem relação com alteração de variáveis presentes na síndrome metabólica. Randell *et al.* (2005) verificaram relação significativa entre níveis de BChE e fatores de risco para a SM, no Canadá. Nesse estudo, indivíduos com SM, apresentaram níveis mais altos da atividade de BChE. Os autores citam que o significado funcional destes resultados ainda é incerto, mas existem estudos (DE VRIESE *et al.*, 2004) que sugerem que a BChE tenha papel na clivagem da grelina, um hormônio produzido no estômago e envolvido na indução de adiposidade e ganho de peso por estimular o apetite. Considerando que a grelina acilada está associada ao aumento de peso, a sua desacilação pela BChE a torna inativa. Essa função da BChE é considerada uma adaptação para o balanço energético e, portanto, relacionada ao desenvolvimento e progressão da obesidade (RANDELL *et al.*, 2005).

Indivíduos com fenótipo CHE2 C5+ apresentaram atividade total e relativa de todas as formas moleculares superiores aos indivíduos com fenótipo CHE2 C5-. Esse resultado já é conhecido na literatura (ALCÂNTARA *et al.* 2003; CHAUTARD-FREIRE-MAIA *et al.*, 1991). A maior atividade da butirilcolinesterase em portadores do fenótipo CHE2 C5+ possivelmente altera as funções desempenhadas pela BChE, porém não foram detectadas diferenças significativas entre os fenótipos quanto as variáveis tratadas neste estudo. Sabe-se que as formas moleculares da BChE são parcialmente interconvertíveis (MASSON, 1989), e também que a proteína associada ao tetrâmero, que determina o fenótipo C5+, tem papel na tetramerização.

As consequências da SM já afetaram os sistemas de saúde de todo o mundo. Discute-se hoje como financiar as demandas crescentes impostas pelas complicações de SM. Para evitá-las, os hábitos das pessoas devem ser mais efetivamente voltados aos principais componentes de políticas de uma vida saudável, dentre os quais destaca-se a atividade física e o incentivo à aquisição de hábitos alimentares saudáveis (RENNIE *et al.*, 2003).

Diante dos aspectos discutidos, pode-se afirmar que correlações com variáveis bioquímicas, IMC, apontam uma evidência do papel da BChE na causa, curso ou prognóstico da SM.

## 6 CONCLUSÕES

O gene *BCHE* está relacionado à obesidade e metabolismo de lipídeos, visto a maior frequência da mutação *1914G* no grupo de obesos, bem como o fato de que a variante atua como um fator independente no aumento do IMC.

Indivíduos portadores do alelo *1914G* podem apresentar diminuição na capacidade da enzima manter a homeostase no metabolismo de lipídeos durante o stress metabólico causado pelo aumento dos níveis de triglicerídeos e IMC

Efeitos anteriormente atribuídos a *-116A*, possivelmente sejam de fato, associados a *1914G*, ou ao efeito conjunto das variantes em desequilíbrio de ligação.

A enzima participa do metabolismo de lipídeos, e os resultados corroboram a hipótese de que esteja associada com os fatores incluídos nos critérios de risco de SM.

Possivelmente alterações metabólicas, em diferentes níveis, alteram a expressão do gene *BCHE*

A tetramerização provavelmente é importante para a função da BChE e manutenção da homeostase.

Este trabalho permitiu auxiliar na investigação de perfis genéticos e bioquímicos da BChE relacionados aos fatores de risco de síndrome metabólica. E assim foram reforçadas as hipóteses de associação da BChE com metabolismo de lipídios, consequentemente com SM.

## 7 REFERÊNCIAS

- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Formas moleculares da butirilcolinesterase (BChE) e índice de massa corporal (IMC). **Genet. Mol. Biol.** v. 22, p. 213, 1999.
- ALCÂNTARA, V. M. **Fenótipos da butirilcolinesterases e suas relações com dados antropométricos, bioquímico-hormonal e pressão arterial em obesos na população de Curitiba, PR.** 230f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.
- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Association of the *CHE2* locus with body mass index and butyrylcholinesterase activity. **Hum Biol.** v. 73, p. 587-595, 2001.
- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Butyrylcholinesterase and obesity in individuals with the *CHE2* C5+ and *CHE2* C5– phenotypes. **Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.**, v. 27, p. 1557-1564, 2003.
- ALCÂNTARA, V. M. *et al.* Butyrylcholinesterase activity and metabolic syndrome in obese patients. **Clin. Chem. Lab. Med.** v. 43(3), p 285-288, 2005.
- ALTAMIRANO, C. V.; BARTELS, C. F.; LOCKRIDGE, O. The butyrylcholinesterase K-variant shows similar cellular protein turnover and quaternary interaction to the wild-type enzyme. **J. Neurochem.** v. 74, p. 869-877, 2000.
- ANDERSEN, B.; ROSENFELD, M. G. POU Domain Factors in the Neuroendocrine System: Lessons from Developmental Biology Provide Insights into Human Disease. **Endocrine Reviews**, v. 22, n.1, p. 2–35, 2001.
- ARPAGAU, M. *et al.* Structure of the gene for human butyrylcholinesterase: Evidence for a single copy. **Biochemistry**, v. 29, p. 124-131, 1990.
- ATHANASSIOU K.; ATHANASSIOU, P. Metabolic syndrome and sleep apnea. **Hippokratia**, v.12 (2), p. 81-86, 2008.
- BARBATO, A. *et al.* Relationships of PAI-1 levels to central obesity and liver steatosis in a sample of adult male population in southern Italy. **IEM**, V. 4 (4), p. 315-323, 2009.
- BARTELS, C. F.; VAN DER SPEK, A. F. L.; LA DU, B. N. Two polymorphisms in the non-coding regions of the *BCHE* gene. **Nucleic Acids Res.** v. 18, p. 6171, 1990.
- BENYAMIN B. *et al.* GWAS of butyrylcholinesterase activity identifies four novel loci, independent effects within *BCHE* and secondary associations with metabolic risk factors. **Human molecular genetics**, v. (20) 4504-4514, 2011.
- BOBERG, D. R. **Formas moleculares da butirilcolinesterase e obesidade** 84f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

BOBERG, D. R. *et al.* Molecular forms of butyrylcholinesterase and obesity. **Genetics and Molecular Biology**, v. 33, n. 3, 2010.

BRANDÃO, A. P. *et al.* I diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento de síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. v. 84 suplemento I, p. 8-28, 2005

BURKE G. L.; BELL R. A. Global trends in cardiovascular disease: incidence and risk factors. In: WONG N. D.; BLACK H. R.; GARDIN J. M. **Preventive Cardiology**. New York: Mc-Graw-Hill, p. 21-46, 2000.

CAVIGELLI, M. *et al.* Induction of c-fos expression through JNK-mediated TCF/Elk-1 phosphorylation. **EMBO J.** v. 14, p. 5957-5964, 1995.

CHATONNET, A.; LOCKRIDGE, O. Comparison of butyrylcholinesterase and acetylcholinesterase. **Biochem. J.** v. 260, p. 625-634, 1989.

CHAUTARD-FREIRE-MAIA, E. A. *et al.* The C<sub>5</sub> isozyme of serum cholinesterase and adult weight. **Hum. Hered.** v. 41, p. 330-339, 1991.

CHAVES, T. J. *et al.* -116A and K *BCHE* gene variants associated with obesity and hypertriglyceridemia in adolescents from Southern Brazil. **Chem Biol Interact**, v. 191, 2012.

CLEARY, M. A.; HERR, W. Mechanisms for Flexibility in DNA Sequence Recognition and VP16-Induced Complex Formation by the Oct-1 POU Domain. **Mol. Cell. Biol.** v. 15, n. 4, p. 2090–2100, 1995.

ÇOKUĞRAŞ, A. N. Butyrylcholinesterase: Structure and Physiological Importance. **Turk. J. Biochem.** v. 28 n. 2 p. 54-61, 2003.

DALLONGEVILLE, J. *et al.* Household Income is associated with the risk of metabolic syndrome in a sex-specific manner **Diabetes Care** v. 28 p. 409-415, 2005.

DE VRIESE, C. *et al.* Ghrelin Degradation by Serum and Tissue Homogenates: Identification of the Cleavage Sites **Endocrinology** v. 145 p. 4997-5000, 2004.

DIETZ, *et al.* Improved method for the differentiation of cholinesterase variants. *American journal of human genetics* 1972;24:58-64.

ERVIN, R. B. Prevalence of Metabolic Syndrome Among Adults 20 Years of Age and Over, by Sex, Age, Race and Ethnicity, and Body Mass Index: United States, 2003–2006. **National Health Statistics Reports** n. 13, 2009.

EVANS, R.T.; WROE, J. Is serum cholinesterase activity a predictor of succinyl choline sensitivity? An assessment of four methods. *Clin. Chem.*, v. 24, p. 1762-1766, 1978.

FADEL-PICHETH, C. **Variabilidade do loco *BCHE* da butirilcolinesterase e peso do adulto em amostra de Curitiba**. 107f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1991.

FORD E. S. *et al.* Trends in waist circumference among US adults. **Obes Res** v. 26 n. 0211:1223–1231, 2003.

FURTADO-ALLE, L. *et al.* Association of variants of the –116 site of the butyrylcholinesterase *BCHE* gene to enzyme activity and body mass index. **Chemico-Biological Interactions** v. 175, p. 115–118, 2008.

GRUNDY, S. M. *et al.* Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/ American Heart Association conference on scientific issues related to definition. **Circulation**, v. 109, p. 433-438, 2004.

GRUNDY, S. M. *et al.* Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. **Circulation**, v.106 (25), p. 3143-3421, 2002.

HANIN, G.; SOREQ, H. Cholinesterase-Targeting microRNAs Identified in silico Affect Specific Biological Processes. **Front Mol Neurosci**, v. 4 (28), 2011.

HARRIS, H. e WHITTAKER, M. Differential inhibition of human serum cholinesterase with fluoride. Recognition of two new phenotypes. **Nature**, v. 191, p. 496-8, 1961.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D.A; ROBSON, E.B. Two-dimensional electrophoresis of pseudocholinesterase components in human serum. **Nature**, v.196, p. 1296-1298, 1962.

HERR, W.; CLEARY, M. A. The POU domain: versatility in transcriptional regulation by a flexible two-in-one DNA-binding domain. **Genes & Development**, v. 9, p. 1679-1693, 1995.

HOSSAIN, P.; KAWAR B.; NAHAS M. E. L. Obesity and Diabetes in the Developing World – A Growing Challenge. **N. Engl. J. Med.** v. 356 n. 3, p. 214-215, 2007.

JACKOWSKI, D. **Variabilidade do gene *BCHE* em amostra de afrodescendentes**. 60 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

JBILLO, O. *et al.* Promoter and Transcription Start Site of Human and Rabbit Butyrylcholinesterase Genes. **J. Biol. Chem.** v. 269, n. 33, p. 20829-20837, 1994.

KÁLMÁN, J. *et al.* Increased serum butyrylcholinesterase activity in type IIb hyperlipidaemic patients. **Life Sciences** v. 75, p. 1195-1204, 2004.

KALOW, W. e GENEST, K. A method for the detection of atypical forms of human serum cholinesterase. Determination of dibucaine numbers. **Canad. J. Biochem. Physiol.**, v. 35, p. 339-346, 1957.

KASSI, E. *et al.* Metabolic syndrome: definitions and controversies. **BMC Medicine**, v.9 (48), p. 1-13, 2011.

KRAPP, A.; STRUBIN, N. B-Cell Coactivator OBF-1 Exhibits Unusual Transcriptional Properties and Functions in a DNA-Bound Oct-1-Dependent Fashion. **Mol. Cell. Biol.** v. 19, p. 4247-4254, 1999.

KUTTY K. M. Biological function of cholinesterase. **Clinical biochemistry**, v.13 p. 239-243, 1980.

LEGAY, C. *et al.* Cloning and expression of rat acetylcholinesterase subunit: generation of multiple molecular forms and complementary with a Torpedo collagenic subunit. **J. Neurochem.** v. 60, p. 337-346, 1993.

LI, H. *et al.* Lamellipodin proline rich peptides associated with native plasma butyrylcholinesterase tetramers. **Biochem. J.** v. 411, p. 425–432, 2008.

LOCKRIDGE, O. *et al.* Complete aminoacid sequence of human serum cholinesterase. **J. Biol. Chem.** v. 262, p. 549-557, 1987.

MASSON, P. A naturally occurring molecular form of human plasma cholinesterase is an albumin conjugate. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 988, p. 258-266, 1989.

MASSON, P. *et al.* Effects of mutations of active site residues and amino acids interacting with the  $\alpha$  loop on substrate activation of butyrylcholinesterase. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1544, p. 166-176, 2001.

MEIGS, J. B. Epidemiology of the metabolic syndrome. **Am. J. Manag. Care**, v. 8, p. 283-292, 2002.

MIKAMI, L.R. **Variabilidade dos exons 2 e 4 do gene *BCHE* e sua relação com atividade da butirilcolinesterase**. 180 f. Tese (Doutorado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

NACHON, F. *et al.* Engineering of a monomeric and low glycosylated form of human butyrylcholinesterase: expression, purification, characterization and crystalization. **Eur. J. Biochem.** v. 269, p. 630-637, 2002.

NCBI (NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acessado em 04/03/2013.

OLIVEIRA, M. Síndrome Metabólica. **Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia**. Disponível em: <<http://www.endocrino.org.br/sindrome-metabolica/>> Acesso em: 04/03/2013.

ORESKOVIC, K. e KUNEC-VAJIC, E. Pseudocholinesterase in alloxan-diabetic rats. **Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol**, v. 78, p. 117-120, 1992.

PARNAS, M. L. *et al.* Concordance of Butyrylcholinesterase Phenotype With Genotype. **Am. J. Clin. Pathol.** v. 135, n. 2, p. 271-276, 2011.

PECKETT, A. J. *et al.* The effects of glucocorticoids on adipose tissue lipid metabolism. **Metabolism Clinical and Experimental.** v. 60, p. 1500–1510, 2011

RANDELL E. W. *et al.* Relationship between serum butyrylcholinesterase and the metabolic syndrome. **Clin. Biochem.** v. 38, p. 799-805, 2005.

RENNIE, K. L. *et al.* Association of the metabolic syndrome with both vigorous and moderate physical activity **Int J Epidemiol** v. 32 p. 600-606, 2003.

ROBINSON, A.R. *et al.* A new technique for differentiation of hemoglobin. **J. Lab. Clin. Med.** v. 50, p. 745-752, 1957.

ROBITZKI A. *et al.* Transfection of reaggregating embryonic chicken retinal cells with an antisense 5'-DNA butyrylcholinesterase expression vector inhibits proliferation and alters morphogenesis. **J. Neurochem.** v. 69, n. 2, p. 823-833, 1997.

RUBINSTEIN, H. M.; DIETZ, A. A.; LUBRANO, T. E.<sup>1K</sup>, Another quantitative variant at cholinesterase locus1. **J. Med. Genet.** v. 15, p. 27-29, 1978.

SALAROLI, L. B. *et al.* Prevalência de Síndrome Metabólica em Estudo de Base Populacional, Vitória, ES – Brasil **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.** v. 51 n. 7, p. 1143-1152, 2007.

SAMBROOK, J. *et al.* **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**, 2<sup>a</sup> ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA, 1989.

SHNIDER, S. M. Serum cholinesterase activity during pregnancy, labor and the puerperium. **Anesthesiology** v. 26, p. 335-339, 1965.

SRIDHAR, G. R. *et al.* Serum butyrylcholinesterase in type 2 diabetes mellitus: a biochemical and bioinformatics approach **Lipids in Health and Disease** v. 4 p. 01-05, 2005.

SRIDHAR, G. R. *et al.* Butyrylcholinesterase in metabolic syndrome **Med Hypotheses** v. 75 p. 648-651, 2010.

SILVA, I. M. *et al.* Effects of physical exercise on butyrylcholinesterase in obese adolescents. **Genetics and molecular biology.** v. 35, p. 741-742, 2012.

STEPHENS, J. M. The fat controller: Adipocyte development. **PLOS Biology**, v. 10 (11) p. 1-3, 2012.

SOUZA, R. L. R. **Estudos sobre nova banda da butirilcolinesterase humana (C<sub>4/5</sub>) verificada em eletroforese.** 74f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Setor de Ciências Biológicas. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 1995.



SOUZA, R. L. R. *et al.* Possible influence of *BCHE* locus of butyrylcholinesterase on stature and body mass index. **Am. J. Phys. Ant.** v. 326, p. 329-334, 2005.

SUGIMORI, T. Shortened action of succinylcholine in individuals with cholinesterase C<sub>5</sub> isoenzyme. **Canad. Anaesth. Soc. J.** v. 33, p. 321-327, 1986.

VAN ROS, G.; VERVOORT, T. Frequencies of the "atypical" and C<sub>5</sub> variants of serum cholinesterase in Zairians and Belgians. Detection of the C<sub>5</sub> variant by agar gel electrophoresis with an acid buffer. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.** v. 53, p. 633-644, 1973.

WASYLYK, B. *et al.* The c-ets proto-oncogenes encode transcription factors that cooperate with c-Fos and c-Jun for transcriptional activation. **Nature**, v. 346, p. 191-193, 1990.

WESCOE, W. C. *et al.* Regeneration rates of serum cholinesterase in normal individuals and in patients with liver damage. **Am. J. Physiol.**, v. 149, p. 549-551, 1947.

WHO (World Health Organization). **Definition, diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications: Report of WHO a Consultation.** Part 1: diagnosis and classification of diabetes mellitus. Genebra, 1999.

ZIMMET, P. *et al.* Etiology of the Metabolic Syndrome: Potential Role of Insulin Resistance, Leptin Resistance, and Other Players. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 892, p. 25-44, 1999.

## 8 APÊNDICES

## 8.1 Resumo para o 58º Congresso Brasileiro de Genética:

**1914G VARIANT OF THE *BCHE* GENE ASSOCIATED WITH ENZYME ACTIVITY AND BODY MASS INDEX**

Butyrylcholinesterase (BChE) is a serum esterase that has a known role in lipid metabolism, being associated with BMI (body mass index), weight, total cholesterol and fractions. It is encoded by the *BCHE* gene (3q26.1-q26.2), which has more than 70 variants described, including the -116A and 1914G. These mutations are in linkage disequilibrium, and -116A variant had previously been associated with BChE activity and BMI. The present study aimed to investigate association between -116A and 1914G variants of the *BCHE* gene, plasma BChE activity and BMI in a sample of 115 individuals from Curitiba/Brazil. The two *BCHE* gene variants were genotyped by Taqman Genotyping Assays; plasma BChE activity was measured using propionylthiocholine as substrate; and statistical analysis were performed using Clump, Statistica for Windows and Arlequin 3.0. Genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium for both sites. The -116A variant was found with similar frequencies in obese (BMI  $\geq 30$ ) and in non-obese (BMI  $< 30$ ) individuals ( $5.6 \pm 3.1$  and  $7.4 \pm 1.9$ , respectively;  $\chi^2 = 0.02$ ;  $p = 0.87$ ). The 1914G variant was found with different frequencies in obese and in non-obese ( $74.1 \pm 5.9$  and  $55.4 \pm 3.8$ , respectively;  $\chi^2 = 5.21$ ;  $p = 0.02$ ). As described in previous studies, BChE activity is significantly lower in carriers of -116A variant than in homozygotes for the usual allele ( $3.59 \text{ KU/L} \pm 1.31 \text{ KU/L}$  and  $4.54 \text{ KU/L} \pm 1.41 \text{ KU/L}$ , respectively;  $t = 2.59$ ;  $p = 0.01$ ). We also found that the carriers of 1914G variant showed significantly lower BChE activity when compared to 1914A homozygotes ( $4.21 \text{ KU/L} \pm 1.20 \text{ KU/L}$  and  $5.06 \text{ KU/L} \pm 1.71 \text{ KU/L}$ , respectively;  $t = 2.80$ ;  $p = 0.006$ ). Analysis of linkage disequilibrium showed that the 116A variant was found in cis with 1914G ( $\chi^2 = 17.25$ ;  $p < 0.0001$ ;  $D' = 1$ ). Higher mean of BMI was found in 1914G carriers than in 1914A homozygotes ( $27.57 \pm 4.86$  and  $25.55 \pm 3.37$ , respectively;  $t = 2.34$  e  $p = 0.02$ ). Considering that the 1914G variant has higher frequency than -116A and also the linkage disequilibrium between the two alleles, we suggest that the 1914G, rather than -116A, may be responsible for the decrease in BChE activity and associated to higher BMI.

**Keywords:** BChE activity, Obesity, -116A variant, 1914G variant.

## 8.2 Resumo para o XV Congresso Brasileiro de Obesidade e Síndrome Metabólica:

### **ATIVIDADE RELATIVA DAS FORMAS MOLECULARES DA BUTIRILCOLINESTERASE E OBESIDADE**

A obesidade pode provocar alterações metabólicas múltiplas que contribuem para o desenvolvimento de diversas doenças. Estudos sugerem que a enzima butirilcolinesterase (BChE) está relacionada ao metabolismo de lipídeos e às lipoproteínas. A BChE humana é uma esterase plasmática, cuja síntese ocorre no fígado e é distribuída para outras partes do corpo. A enzima pode ser encontrada no plasma sob quatro formas homoméricas: monômeros (G1); dímeros (G2); trímeros (G3) e tetrâmeros (G4), ou sob formas heteroméricas, através da associação com outras proteínas, tais como a albumina (G1-alb). Este trabalho teve como objetivo mensurar a atividade relativa (AR) das formas moleculares da BChE, e relacioná-las a variáveis envolvidas no metabolismo. Foi utilizada amostra populacional de 284 indivíduos de Curitiba/PR. A medida da atividade plasmática total da BChE foi obtida utilizando propioniltiocolina como substrato. A detecção das intensidades relativas (IR) das bandas referentes às formas moleculares da BChE foi realizada com eletroforese em gel de poliácridamida e quantificação pelo programa *KODAK 1D Image Analysis Software*. O grupo de obesos apresentou maior atividade total e AR de G4 ( $4,74 \pm 1,45$  e  $3,21 \pm 1,17$ ) que não obesos ( $4,50 \pm 1,61$  e  $2,87 \pm 0,97$ ;  $Z=1,99$ ;  $p=0,04$  e  $Z=2,38$ ;  $p=0,02$  respectivamente). A ausência de diferença estatística quanto à AR das bandas G1, G1-alb e G2 provavelmente se deve à amostra possuir indivíduos de ambos os sexos, sendo conhecido que homens apresentam atividade da BChE maior que mulheres, podendo então interferir quando se considera a amostra estratificada apenas em obesos e não-obesos. Análises de correlação indicaram significância entre a atividade total, e todas as variáveis dependentes consideradas (IMC, níveis de triglicerídeos, HDL e LDL-colesterol, glicemia e colesterol total). O tetrâmero é a forma molecular mais comum no plasma e sua relação com IMC e LDL, sugere a participação ativa da BChE no metabolismo. A AR do monômero também mostrou relação com IMC e triglicerídeos, considerando que G1 é a forma molecular mais imediata da expressão gênica, pode-se constatar que estados metabólicos possivelmente afetam a regulação da expressão de *BCHE*.

**Palavras chaves:** Butirilcolinesterase, metabolismo, obesidade, IMC.

## **9 ANEXOS**

### **9.1 Descrição da metodologia utilizada**

#### **9.1.1 Amostras**

As amostras foram obtidas por meio de parceria entre o Laboratório de Polimorfismos e Ligação, do departamento de Genética (UFPR) e o Núcleo de Qualidade de Vida (NQV) e Centro de Performance Física (CEPEFIS), do departamento de Educação Física (UFPR) e consistem de material coletado de 290 servidores da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Todos os sujeitos que participaram tiveram esclarecimentos individuais a respeito dos objetivos, procedimentos utilizados, e condicionaram a sua participação de modo voluntário mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Não há diferenciação de grupos raciais ou étnicos, nem seleção por classe social.

Quanto às variáveis antropométricas, foram efetuadas medidas de: massa corporal (em quilogramas – kg), estatura (em metros – m), Índice de Massa Corporal (IMC) utilizando valores de peso corporal (kg) e estatura ( $m^2$ ), circunferência abdominal (CA) (em centímetros – cm), dobras cutâneas (em milímetros – mm)

As variáveis bioquímicas foram mensuradas nas sessões de Bioquímica, Hematologia e de Dosagens Hormonais do Serviço de Análises Clínicas do Hospital de Clínicas da UFPR. Foram obtidos valores de glicemia em jejum, colesterol total (CT), HDL e LDL-colesterol e triglicerídeos.

#### **9.1.2 Extração do DNA**

A técnica de extração de DNA pelo método de Lahiri e Nurnberger (1991) (com modificações) consiste na separação, a partir do sangue periférico, dos leucócitos de onde será extraído DNA. São coletados 10 mL de sangue em EDTA e após separação do plasma, utiliza-se os leucócitos, junto às hemácias suspensas.

Ressuspende-se este material em 10 mL de TKM1 (Tris-HCl 0,01 M pH 7,6; KCl 0,01 M; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M; EDTA 0,002M) e 125 µL de IGEPAL CA-630. Após centrifugar a 2500 rpm por 15-20 minutos, despreza-se o sobrenadante e completa-se novamente para 10 mL com TKM1. Repete-se a centrifugação e a ressuspensão em TKM1 até que o precipitado fique bem claro. Após ressuspensão delicada do precipitado, são adicionados 800 µL de TKM2 (Tris-HCl 0,01 M pH7,6; KCl 0,01 M; MgCl<sub>2</sub> 0,01 M; EDTA 0,002 M; NaCl 0,4 M) agitando-se bem. Adiciona-se 50 µL de SDS 10% e mistura-se. Incuba-se então em banho-maria a 55°C durante a noite. Retira-se do banho-maria no dia seguinte e adiciona-se 300 µL de NaCl saturado (6 M) e mistura-se bem. Após a qual é feita centrifugação a 12000 rpm por 10-20 minutos, transfere-se o sobrenadante para um tubo de ensaio e adiciona-se dois volumes de etanol 100%, gelado, tampa-se o tubo com parafilme e inverte-se várias vezes (delicadamente) até precipitar o DNA. Pesca-se o DNA utilizando micropipeta e coloca-se em tubo de 1,5 mL. Lava-se o DNA obtido com etanol 70%, dispensando posteriormente o álcool. O tubo é mantido semi-aberto na estufa a 37°C, até evaporar todo o álcool. O DNA é ressuspendido em 200 µL de tampão TE (Tris HCl pH8,0 0,01 M e EDTA pH 8,0 0,001 M) e deixa-se no banho-maria a 55°C por uma hora. Após três dias na geladeira, verifica-se a densidade óptica e congela-se.

### 9.1.3 Genotipagem das variantes alélicas – *Taqman*

As variantes dos sítios -116 e 1914 do gene *BCHE* foram genotipadas por *Taqman* (*TaqMan SNP genotyping assays* com Kit da *Applied Biosystems*).

Para a aplicação da técnica, são necessários três segmentos de ácidos nucléicos: a dupla fita de DNA para servir de molde (amostra) e dois oligonucleotídeos (primers) específicos, de fitas simples e complementares as duas fitas molde de DNA, desenhados de modo a flanquear a sequência a ser amplificada. Além disso, são necessários DNA polimerase, dNTPs, tampão e sais (MgCl). A técnica consiste de ciclos repetitivos; cada ciclo está dividido nos passos:

- 1º) Desnaturação do DNA a alta temperatura, devido ao rompimento das pontes de hidrogênio que unem as duas fitas.
- 2º) Anelamento dos primers em posições específicas (cuja temperatura é definida em função da sequência nucleotídica dos primers).

3º) Extensão da sequência a ser amplificada pela ação da DNA polimerase.

Os dois primers são marcados com dois fluoróforos diferentes, um na extremidade 5', o "repórter", e outro na extremidade 3', o "quencher". Durante a fase de anelamento, as sondas TaqMan hibridam com a sua cadeia complementar. Tendo como base a atividade exonucleotídica 5' da Taq DNA polimerase, durante a fase de extensão, a sonda "reporter" é clivada pela Taq DNA polimerase, e o fluoróforo é liberado. Com passar dos ciclos da reação em cadeia da polimerase (PCR) vai haver o aumento da intensidade da fluorescência, sendo esta proporcional ao aumento do número de produtos de amplificação. Se somente uma das fluorescências está presente, é possível dizer que a amostra é homozigota para aquele alelo, se as duas forem detectadas, a amostra é considerada heterozigota possuindo os dois alelos marcados pelas sondas.

Durante cada ciclo, as fitas complementares de DNA são copiadas pela extensão dos primers que se anelam em posições opostas. Desta forma, cada fita de DNA recém amplificada é usada como molde no ciclo seguinte, resultando assim, no acúmulo exponencial do fragmento de DNA flanqueado pelos dois primers.

As soluções e quantidades utilizadas foram: 9 µL PCR Master Mix por amostra, contendo todos os reagentes necessários para a reação de amplificação, inclusive o primer. Esta solução é acrescida de 1 µL de amostra de DNA em concentração de 20 ng/ µL. Este material é aplicado em placa de 96 poços para PCR. As etapas do ciclo foram: 1) 50°C por 2 minutos 2) 95°C por 10 minutos 3) repetição por 50 vezes de 95°C por 15 segundos, intercaladas com 62°C por 1 min.

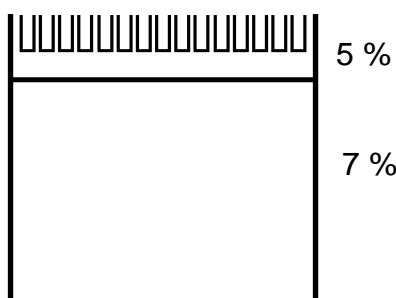
As reações foram realizada pelo aparelho Mastercycler Realplex 2 da Eppendorf.

#### **9.1.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida para a detecção das bandas G1, G1-alb, G2 e G4**

Eletroforese em gel de poliacrilamida foi realizada seguindo protocolo semelhante ao de Sambrook *et al.* (1989), com dois gradientes de densidade. A preparação dos géis foi baseada em Alcântara (2000) com adaptações de Boberg *et al.* (2010).

O gel de poliacrilamida contém dois gradientes de densidade, um gel de alinhamento com concentração equivalente a 5%, com 1 cm de comprimento, e um gel de separação com concentração de 7%, com 13 cm de comprimento (Figura 2). O gel de separação é colocado primeiro entre as placas (170 x 160 x 0,8mm). Logo em seguida coloca-se uma fina camada de álcool butílico e deixa-se polimerizar por 30 minutos. Após esse tempo, coloca-se o gel de alinhamento, deixando para polimerizar por 20 minutos. Os reagentes utilizados no preparo dos géis estão listados na tabela 2. A placa com gel, então, é deixada em repouso por aproximadamente 24 horas em local refrigerado.

Para aplicar as amostras no gel, é previamente feita a mistura de 5 µL de plasma com 7 µL azul de bromofenol. Então é aplicado no gel entre as placas e realizada a corrida eletroforética por 8 horas a tensão de 100V, corrente elétrica de 20 mA, à 4 °C, sendo que o tampão de corrida utilizado na cuba é o TBE 1X.



**Figura 2.** Esquema do gel de poliacrilamida com 2 gradientes de concentração.

Tabela 2: Reagentes utilizados no preparo das duas concentrações do gel para eletroforese

Reagentes	Concentrações do gel	
	5% (mL)	7% (mL)
Poliacrilamida (29g acrilamida: 1g bisacrilamida)	3,5	7
TBE (Tris-ácido bórico-EDTA) 1X	16,5	23
Persulfato de amônia 10%	0,250	0,250
TEMED (N,N,N',N'-Tetra metiletilenodiamina)	0,025	0,025

Após a corrida, o gel é então imerso em solução de coloração (150 mg de Fast Red TR 0,2%; 60 ml de tampão fosfato – pH 7,1; 2,1 ml de solução de acetato

de  $\alpha$ -naftil dissolvido em acetona 3,4%) e incubado a 37 °C na estufa, por 30 a 40 minutos. A butirilcolinesterase do plasma hidrolisa o acetato de  $\alpha$ -naftila formando  $\alpha$ -naftol e ácido acético. O  $\alpha$ -naftol reage com o sal de Fast Red TR, produzindo um derivado de cor púrpura, que revela as bandas referentes às diversas formas moleculares da BChE no gel. Ao término da coloração, o gel é lavado três vezes com água destilada, e colocado entre duas folhas de transparência. Em seguida, o gel é digitalizado e o registro arquivado para posterior análise pelo programa *KODAK1D Image Analysis Software* (de acordo com Boberg, 2008). Indivíduos que não tiveram alguma das bandas detectadas foram excluídos das análises.

#### 9.1.5 Medida da atividade da BChE

O método foi desenvolvido por Dietz *et al.* (1972), e modificado por Evans e Wroe (1978). A medida da atividade é feita em espectrofotômetro devidamente ajustado em 410 nm, com reagentes mantidos em banho-maria a 25°C. O tampão fosfato 0,1 M utilizado na reação (pH 7,6) é preparado pela mistura de duas soluções “a” e “b” até a obtenção do pH adequado. A solução “a” contém 4,73 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  anidro (PM = 141,96) em 1000 mL de água destilada. A solução “b” contém 13,61 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  anidro (PM = 136,09) em 1000 mL de água destilada. O DTNB (ácido 5,5'-bisditio-2-nitrobenzóico) (0,423 mM) é dissolvido em tampão fosfato na proporção de 167g por 1000 mL. O substrato (propioniltiocolina 100 mM) é preparado com 303 mg de iodeto de propioniltiocolina (PM = 303,2) em 10 mL de água destilada. Os tubos contendo 2,2 mL de tampão-DTNB, e 0,25 mL de plasma diluído (1/100 em água destilada) devem ser mantidos por três minutos no banho-maria a 25°C antes da leitura em espectrofotômetro. Após os três minutos deve ser adicionado 0,05 mL de substrato e iniciada a leitura. A primeira leitura, chamada A0, deve ser efetuada imediatamente após a colocação dos reagentes na cubeta termostaticada do espectrofotômetro. As leituras A1, A2 e A3 são efetuadas com um, dois e três minutos a partir da leitura A0. Após as quatro leituras, deve ser calculado o  $\Delta/\text{minuto}$  (variação de absorbância por minuto). Para a obtenção da atividade (KU/L),  $\Delta/\text{minuto}$  é multiplicado pelo fator de correção 73,53 e por dividido por 1.000. Essa metodologia é baseada na hidrólise da propioniltiocolina pela BChE,



produzindo ácido propiônico e tiocolina, a qual reage com o DTNB, gerando 5-tio-2-nitrobenzoato de coloração amarela.

#### **9.1.6 Eletroforese em gel de ágar para fenotipagem do loco *CHE2***

Esta técnica foi desenvolvida por Robinson *et al.* (1957) para fenotipagem de variantes da hemoglobina e posteriormente, foi modificada por Van Ros e Vervoort (1973) para aplicação dessa técnica à BChE. Adaptações subsequentes foram introduzidas por Fadel-Picheth (1991) e Souza (1995). O gel de ágar é preparado com uma solução de Bacto ágar (Difco) a 1,4% p/v em tampão citrato de sódio, pH 6,38 (solução estoque de tampão citrato de sódio 50 mM, pH 6,7; pH ajustado com ácido cítrico 1,56 M). Esta solução é aquecida por cerca de sete minutos ou até que o ágar seja totalmente dissolvido, sendo importante não deixar a solução ferver. Após o aquecimento, a solução é vertida sobre uma placa de vidro de 230 x 160 mm. O gel deve resfriar completamente e então ser colocado na geladeira e mantido em repouso por pelo menos 12 horas a fim de diminuir o efeito da eletroendosse. Após esse período de repouso as amostras de plasma são aplicadas no gel através da extremidade de uma lâmina de metal (5 x 5 x 0,1 mm) onde é colocado 1,5 µL de plasma. A placa contendo as amostras é então submetida à eletroforese com tampão citrato pH 6,7 em cuba, por quatro horas (a 4°C; 75 V e 35 mA). Após a corrida eletroforética despeja-se sobre a placa o cromógeno-substrato que deve ser preparado imediatamente antes do uso. A solução cromógeno-substrato é preparada utilizando-se Fast Red TR Salt (SIGMA F-2768) a 0,1% em tampão fosfato de sódio pH 7,1 (670 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,2 M e 330 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 M) e solução de α-naftilacetato dissolvido em acetona 30 mM (2,5% v/v). A placa com o cromógeno-substrato deve ser incubada por uma hora a 37°C. Após a revelação das bandas a placa é lavada com água para retirar o excesso de corante. O gel é então colocado entre uma folha de papel cartão e uma folha de papel filtro, prensado entre duas placas de vidro e levado à estufa a 37°C até completa secagem.